

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIA CONSTANZA RODRIGUEZ**

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *cyp2d15* EM CANIDEOS DOMÉSTICOS E  
SELVAGENS**

**CURITIBA**

**2010**

MARIA CONSTANZA RODRIGUEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *cyp2d15* EM CANIDEOS DOMÉSTICOS E  
SELVAGENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Iglenir João Cavalli

**CURITIBA**

**2010**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética



## PARECER

Os abaixo-assinados, Membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado a que se submeteu **MARIA CONSTANZA RODRIGUEZ**, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas na área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de agosto de 2010

Banca Examinadora:

Profª Drª Enilze Ribeiro - UFPR  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Profª Drª Iliada Rainha de Souza - UFSC  
Membro Titular

Prof. Dr. Atila Visinoni - Universidade Positivo  
Membro Titular

Profª Drª Eleidi Alice Chautard Freire Maia - UFPR  
Membro Titular

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza - UFPR  
Membro Titular

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética



*Do nosso fiel companheiro...*

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Enilze Ribeiro Maria de Fonseca pela amizade, orientação, sugestões e acompanhamento, imprescindíveis para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli pela amizade, carinho, companheirismo, co-orientação, sugestões, ternura e acompanhamento nestes longos anos de estudo e principalmente por acreditar em mim.

Ao Clineu pelas nossas conversas, sugestões, parceria, amor pela pesquisa e apoio laboratorial.

A Rosângela Dietrich e Bianca Chaim Mattos pela amizade e disponibilização de suas amostras.

Aos meus colegas Marcia Beltrame, Marcia Oliveira, Giovana, Clarissa, Marcos, Sarinha, Rafael, Marcio, Danilo, Bruna, Rodrigo, Gustavo, Talita, Tábata, Wanessa, Helô, Naiara ... pela amizade e companheirismo.

Aos professores do PPG-GEN pela dedicação e amor à profissão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Ministério da Educação, pelo apoio financeiro durante o período de realização do curso.

À memória de meu pai, Miguel Angel Lino Rodriguez, pelo exemplo de vida e princípios que carrego comigo.

À minha mãe, Maria Felicitas, pelo carinho, apoio, estímulo e atenção.

Ao Roberto e Bernardo por fazerem parte da minha vida.

## RESUMO

A superfamília do citocromo P450 (P450s) de hemoproteínas é constituída por aproximadamente 500 membros distribuídos entre mais de 70 subfamílias encontradas em eucariotos e procariotos. O gene *cyp2d15*, ortólogo ao *CYP2D6* humano, participa do metabolismo de mais de trinta drogas comercialmente disponíveis além de uma série de xenobióticos ambientais. Várias P450 humanas apresentam expressão polimórfica, principalmente a *CYP2D6*. Este polimorfismo é primariamente caracterizado por dois fenótipos: indivíduos com a atividade normal da *CYP2D6* (metabolizadores rápidos) e indivíduos com diminuição dessa atividade (metabolizadores lentos). Os modelos animais são muito utilizados no desenvolvimento pré-clínico de medicamentos a fim de prever o comportamento metabólico de novos compostos em humanos. Apesar dos membros da família do citocromo 450 possuírem seqüências altamente conservadas entre as espécies, ou seja, há relativamente poucas diferenças na seqüência primária de aminoácidos, até mesmo essas pequenas diferenças podem dar origem a mudanças significativas na especificidade do substrato e na atividade catalítica dessas enzimas, podendo levar também à ativação de procarcinógenos e à formação de metabolitos tóxicos. O presente estudo contém uma revisão bibliográfica sobre o papel do gene do biometabolismo *cyp2d15* e dois capítulos: o primeiro com a caracterização do gene em canídeos domésticos de diferentes raças e o segundo com a caracterização do gene em canídeos selvagens cativos sul-americanos. No primeiro capítulo a caracterização do gene *cyp2d15* em 21 raças caninas onde oito exons foram analisados, revelou cinco SNPs distribuídos em três dos seis exons selecionados. Um total de 1.269 pb de seqüências codificadoras foram reseqüenciadas rendendo uma freqüência média de um SNP para cada 254 pb (1/254). Um total de quatro nsSNPs, os quais podem estar envolvidos na alteração da função protéica foram detectados. No capítulo II a caracterização do gene *cyp2d15* em quatro diferentes espécies de canídeos selvagens cativos sul-americanos (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticuse* *Chrysocyon brachyurus*), revelou oito SNPs distribuídos nos quatro exons selecionados. Um total de 771 pb de seqüências codificadoras foram reseqüenciadas rendendo uma freqüência média de um SNP para cada 96 pb (1/96). Um nsSNP, que pode estar envolvido na alteração da função protéica foi detectado. Com base nestes resultados, destaca-se a importância de novos estudos que caracterizem os polimorfismos genéticos no gene *cyp2d15* em canídeos domésticos e selvagens, devido à ausência destes dados na literatura corrente e da potencial importância em estudos pré-clínicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Canídeos domésticos, Canídeos selvagens, *cyp2d15*, polimorfismos.

## ABSTRACT

Cytochromes P450 (P450s) are a superfamily of hemoproteins consisting of approximately 500 members distributed among more than 70 subfamilies found in eukaryote and prokaryote species. Gene *cyp2d15* is the ortholog of human *CYP2D6*, and plays an important role in the metabolism of over 30 clinically used drugs and of a series of environmental xenobiotics. Several human P450s have been shown to exhibit polymorphic expression, most notably *CYP2D6*. This polymorphism is primarily characterized by two discrete phenotypes: individuals with a normal *CYP2D6* activity (extensive metabolizers) and individuals lacking this activity (poor metabolizers). Animal models are extensively used in the development of pre-clinical drugs to try to predict the metabolic behavior of new compounds in humans. Even though the members of Cytochrome P450 family shows strong conservation among species, there are few differences in the primary amino acid sequence, this small differences can give rise to significant alterations in the substrate specificity and enzyme catalytic activity resulting in the alteration of procarcinogens and the formation of toxic metabolites. The present study shows a bibliographic review about the role of the biometabolism gene *cyp2d15* and two chapters: the first with the characterization of the gene in different breeds of domestic canids and the second with the characterization of the gene in south America native wild canids. The first chapter with the characterization of the *cyp2d15* gene in 21 canine breeds, eight exons of the gene *cyp2d15* were screened revealing five SNPs distributed in three of the six selected exons. A total of 1,269 bp coding sequence was resequenced yielding an average frequency of one SNP per 254 bp (1/254). A total of four nsSNPs, which may be involved in alteration of protein function, were detected. In chapter two, the gene *cyp2d15* characterization in four different species of South America wild canids (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticuse* *Chrysocyon brachyurus*) revealed eight (8) SNPs distributed in the four selected Exons. A total of 771bp coding sequences was sequenced yielding an average frequency of one SNP per 96bp (1/96). One non-synonymous SNP (nsSNP), which may be involved in alteration of protein function, was detected. Based on these results, we highlight the importance of new studies to characterize genetic polymorphisms at *cyp2d15* gene in domestic and wild canids because of the lack of data in the current literature and its potential importance in pre-clinical studies.

KEY-WORDS: domestic canids, wild canids, *cyp2d15*, polymorphisms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 01 -	CANÍDEOS SUL-AMERICANOS: CACHORRO-DO-MATO, CACHORRO-VINAGRE, LOBO-GUARÁ E GRAXAIM-DO-CAMPO ( <i>CERDOCYON THOUS</i> , <i>SPEOTHOS VENATICUS</i> , <i>CHRYSOCYON BRACHYURUS</i> E <i>LYCALOPEX GYMNOERCUS</i> ).....	17
-------------	---	----

FIGURA 02 -	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE <i>cyp2d15</i> EM <i>CANIS FAMILIARIS</i> .....	17
-------------	--	----

FIGURA 03 -	ÁRVORE DA HISTÓRIA CANINA .....	21
-------------	---------------------------------	----

### CAPÍTULO I

FIGURA 01 -	DISTÂNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS ENTRE PARES DE AMINOÁCIDOS.....	43
-------------	--	----

FIGURA 02 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA CIRCULAR DA TROCA DE AMINOÁCIDOS DE ACORDO COM O MÉTODO DE ARGYLE (1980).....	43
-------------	---	----

FIGURA 03 -	SEQÜÊNCIA DE RESÍDUOS: SNSNP, NSSNP E ALTERNÂNCIA DE EXONS...	45
-------------	---	----

FIGURA 04 -	ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQÜÊNCIA DO EXON 10 (74PB) DO GENE <i>cyp2d15</i> DO BANCO DE DADOS PÚBLICO NCBI ( <i>SEQREF BLAST</i> ) COM AS SEQÜÊNCIAS DEMONSTRADA ATRAVÉS DO PROGRAMA <i>SEQSCAPE</i> (APPLIED BIOSYSTEMS).....	45
-------------	--	----

FIGURA 05 -	ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQÜÊNCIA DO EXON 11 (98 PB) DO GENE <i>cyp2d15</i> DO BANCO DE DADOS PÚBLICO NCBI COM AS SEQÜÊNCIAS DEMONSTRADA PELO PROGRAMA <i>SEQSCAPE</i> (APPLIED BIOSYSTEMS)...	46
-------------	---	----

FIGURA 06 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS 11 EXONS E INTRONS DO GENE <i>cyp2d15</i> .....	50
-------------	---	----

FIGURA 07 -	SEQÜÊNCIA ENTRE OS EXONS 9/10 DO GENE <i>cyp2d15</i> PELO PROGRAMA <i>SEQSCAPE</i> (APPLIED BIOSYSTEMS).....	51
-------------	--	----

FIGURA 08 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO TERMINAL AO EXON 9 E INTRON DESCONHECIDO NOS QUATRO ANIMAIS DAS RAÇAS BASSET HOUND, DACHSHUND E HUSKY SIBERIANO.....	52
-------------	---	----

### CAPÍTULO II

FIGURA 01 -	MATRIZES DE LEITURA POSSÍVEIS PARA A SEQÜÊNCIA DO EXON 9 DO GENE <i>cyp2d15</i> .....	68
-------------	---	----

FIGURA 02 -	ALINHAMENTO DO EXON 1 DA SEQÜÊNCIA REFERENCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE CACHORRO-DO-MATO.....	70
-------------	---	----

FIGURA 03 -	ALINHAMENTO DO EXON 6 DA SEQUENCIA REFERENCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE CACHORRO-DO-MATO.....	70
-------------	---	----

FIGURA 04 -	ALINHAMENTO DO EXON 7 DA SEQÜÊNCIA REFERENCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE GRAXAIM-DO-CAMPO.....	71
-------------	---	----

FIGURA 05 -	ALINHAMENTO DO EXON 8 DA SEQÜÊNCIA REFERENCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE CACHORRO-DO-MATO.....	71
-------------	---	----

FIGURA 06 -	ALINHAMENTO DO EXON 9 DA SEQÜÊNCIA REFERENCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE CACHORRO-DO-MATO.....	71
-------------	---	----



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 01 -	EXONS DO GENE <i>cyp2d15</i> SEQUENCIADOS ( 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 E 11) E NÚMERO DE ANIMAIS DE CADA RAÇA.....	40
TABELA 02 -	SEQÜÊNCIAS DE BASES DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, RESPECTIVOS EXONS, TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO E TAMANHO DE FRAGMENTO.....	41
TABELA 03 -	EXONS, NÚMERO DE BASES SEQÜENCIADAS SOBRE O NÚMERO TOTAL DE BASES DE CADA EXON, SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS (SN) SEGUIDAS DA ALTERAÇÃO NO AMINOÁCIDO E NÃO-SINÔNIMAS (NS) E RAÇAS QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.....	44
TABELA 04 -	COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS OBTIDA A PARTIR DA SEQÜÊNCIA DE PARES DE BASES DO EXON 10 DO GENE <i>cyp2d15</i> DO ESPÉCIME DA RAÇA DACHSHUND E POODLE COM AS SEQÜÊNCIAS DE PARES DE BASES REFERÊNCIA DISPONIBILIZADA PELO BANCO DE DADOS PÚBLICO (NCBI) E COM A SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS REPORTADA POR SAKAMOTO ET AL (1995).....	46
TABELA 05 -	COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS OBTIDA A PARTIR DA SEQÜÊNCIA DE PARES DE BASES DO EXON 11 DO GENE <i>cyp2d15</i> DOS ESPÉCIMES DA RAÇA DACHSHUND COM AS SEQÜÊNCIAS DE PARES DE BASES REFERÊNCIA DISPONIBILIZADA PELO BANCO DE DADOS PÚBLICO (NCBI) E COM A SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS REPORTADA POR SAKAMOTO ET AL (1995).....	47
TABELA 06 -	INTRONS, NÚMERO DE BASES SEQÜENCIADAS SOBRE O NÚMERO TOTAL DE BASES DE CADA INTRON, SUBSTITUIÇÕES DAS BASES E RAÇAS QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.....	49
TABELA 07 -	ESTRUTURA GENÔMICA DO <i>cyp2d15</i> MOSTRANDO AS JUNÇÕES INTRON/EXON E OS TAMANHOS DOS INTRONS E EXONS.....	53

### CAPÍTULO II

TABELA 01 -	ESPÉCIE, EXONS DO GENE <i>cyp2d15</i> ( 1, 6, 7, 8 E 9) E NÚMERO DE ANIMAIS SEQÜENCIADOS.....	65
TABELA 02 -	SEQÜÊNCIAS DE BASES DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, RESPECTIVOS EXONS E TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO.....	66
TABELA 03 -	EXONS, NÚMERO DE BASES SEQÜENCIADAS SOBRE O NÚMERO TOTAL DE BASES DE CADA EXON, SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS (SN) SEGUIDAS DA ALTERAÇÃO NO AMINOÁCIDO E NÃO-SINÔNIMAS (NS) E ESPÉCIES QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.....	68
TABELA 04 -	INTRONS, NÚMERO DE BASES SEQÜENCIADAS DE CADA INTRON, E ESPÉCIES QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.....	69
TABELA 05 -	ESTRUTURA GENÔMICA DO <i>cyp2d15</i> MOSTRANDO AS JUNÇÕES INTRON/EXON E OS TAMANHOS DOS INTRONS E EXONS.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKC: *American Kennel Club*  
BRCA1: *Breast Cancer 1*  
BROAD: *BROAD Institute of MIT and Harvard*  
cDNA: DNA Complementar  
CYP P450: Citocromo P450  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
EM: Metabolizador normal  
Gly: Glicina  
GST: *Glutathione-S-transferase*  
GTS-21: DMBX-anabaseína  
Ile: Isoleucina  
Kb: Quilobase  
*mdr1: Multi-drug resistance 1*  
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PAH: *Polycyclic aromatic hydrocarbons*  
PCDD: *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins*  
PCDF: *Polychlorinated dibenzofurans*  
PCB: *Polychlorinated biphenyls*  
Phe: Fenilalanina  
PM: Metabolizador lento  
RCLB: *Red Cell Lysis Buffer*  
RSBC: Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia  
Ser: Serina  
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único  
TCAG: *The Center for the Advancement of Genomics*  
TIGR: *The Institute for Genomic Research*  
UNIPROT: *Universal Protein Resource*  
Val: Valina  
YM-64227: *4-Cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine-2-(1H)-one*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1 AS ENZIMAS DO BIOMETABOLISMO.....	15
3.2 POLIMORFISMOS NOS GENES DE FASE I.....	16
3.3 POLIMORFISMOS NOS GENES DE FASE II.....	18
3.4 POLIMORFISMOS GENÔMICOS E RESPOSTA TOXICOLÓGICA.....	19
3.5 VISÃO GERAL DO TERMO RAÇA.....	21
3.6 MODELO ANIMAL CANINO.....	22
3.7 SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER EM CÃES.....	22
3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>34</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>35</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>36</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
3.1. EXONS.....	42
3.2. INTRONS.....	48
3.3. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS SÍTIOS DE <i>SPLICING</i> .....	52
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>59</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>60</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>61</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>62</b>

<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
3.1. EXONS.....	67
3.2. INTRONS.....	69
3.3 ALINHAMENTO.....	70
3.4. REGIÕES FLANQUEADORAS.....	72
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
1. LISE E HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	81
2. EXTRAÇÃO DO DNA.....	82
2.1 Extração de DNA pelo método do fenol clorofórmio.....	82
2.2 Extração de DNA pelo método de “Salting out”.....	82
3. Reação de Amplificação do gene cyp2d15.....	84
4. Purificação das amostras do gene cyp2d15 amplificado.....	85
5. Seqüenciamento, Precipitação e Desnaturação das Amostras dos Exons do Gene cyp2d15 Amplificados.....	86

## 1. INTRODUÇÃO

No ano de 2003, o Instituto de Pesquisa do Genoma Humano dos EUA (NHGRI- *US National Human Genome Research Institute*), iniciativa acadêmica, financiou investindo 30 milhões de dólares para seqüenciar o genoma de um cão da raça Boxer. Esta raça foi selecionada após a avaliação de outras 60 raças caninas por apresentar a menor variação em seu genoma e fornecer a seqüência referencial de maior confiabilidade (NHGRI, 2007). No mesmo ano a iniciativa privada formada pelo Instituto para Pesquisa Genômica (*TIGR- The Institute for Genomic Research*) e o Centro de Genômica Avançada (*TCAG- The Center for the Advancement of Genomics*) seqüenciaram e analisaram com uma cobertura de 1,5X o genoma de um cão macho da raça Poodle (KIRKNESS *et al*, 2003). Em 2005, o grupo internacional que participou da iniciativa acadêmica liderado por pesquisadores do Instituto MIT e da Universidade de Harvard anunciou a publicação da seqüência do genoma do cão. Na edição de dezembro daquele ano da revista *Nature*, os pesquisadores apresentaram uma análise detalhada do genoma canino e descreveram como estes dados oferecem grande potencial em relação a melhorar a saúde do homem e do cão (LINDBLAD *et al.*, 2005). Na análise comparativa do genoma canino o grupo de pesquisa descobriu que enquanto raças diferentes mostram grandes diversidades físicas, compartilham longos segmentos de DNA, indicando sua origem recente comum. Como resultado, as metodologias genéticas desenvolvidas no Instituto BROAD (MIT e Harvard) e no NHGRI para qualquer raça canina serão úteis para experimentos genéticos em quase todas as raças (LINDBLAD *et al.*, 2005). Pouco se conhece sobre a variabilidade genética das espécies canídeas da fauna nativa da América do Sul como o cachorro-do-mato, graxaim-do-campo, cachorro-vinagre e lobo-guará (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*) (Figura 1). Os esforços foram concentrados no seqüenciamento do genoma do cão doméstico e em algumas seqüências aleatórias de canídeos norte-americanos como o lobo cinzento (*Canis lupus*) e o coiote (*Canis latrans*) (LINDBLAD *et al.* 2005). Contudo estas seqüências

fornece matéria-prima para a identificação de marcadores para análises genéticas de larga escala da maioria das espécies caníneas.

O genoma canino é similar ao genoma humano e de outros mamíferos em tamanho e contém aproximadamente 2,5 bilhões de pares de bases de DNA. Muitos cães são suscetíveis a doenças genéticas de difícil estudo em seres humanos, como o câncer, doenças cardíacas, surdez, cegueira e desordens autoimunes devido a uma longa história de seleção de cruzamentos e altas taxas de endocruzamento. Além disso, o cão é um modelo importante para a genética do comportamento e para as pesquisas da indústria farmacêutica (NHGRI, 2007). Muitas das doenças genéticas, inclusive o câncer, que ocorrem em cães são similares às doenças genéticas em humanos. Abordagens comparativas objetivam caracterizar e mapear as doenças genéticas podendo resultar em muitos benefícios tanto para cães quanto para seres humanos (REIMANN *et al.*, 1999).

A farmacogenética estuda a correlação entre variações genéticas e a resposta aos fármacos. Essa abordagem é importante para a oncologia já que a quimioterapia do câncer é certamente a modalidade terapêutica responsável por uma elevada incidência de toxicidade, resultando com frequência em severa morbidade ou mesmo óbito (REIS, 2006). Segundo ANTUOFERMO (2007) o estabelecimento de modelos animais para teste de tratamentos e modalidades preventivas no estudo de lesões mamárias intra-epiteliais, por exemplo, é um pré-requisito nas triagens clínicas humanas.

Os cães são uma espécie extensivamente utilizada pela indústria farmacêutica, contudo sabe-se relativamente pouco sobre o seu metabolismo (ROUSSEL *et al.*, 1998). Há poucos trabalhos que descrevem diferenças farmacogenéticas em animais, em contraste com há grande quantidade de informações farmacogenéticas em seres humanos. As diferenças genéticas e fenotípicas entre as raças podem influenciar os efeitos de uma dose em relação à segurança e efetividade do produto. É importante compreender estas diferenças para melhorar as predições de dose de medicamentos nas populações caninas e, ainda, extrapolar dados toxicológicos dos cães para os seres humanos. A melhor compreensão das diferenças entre as raças aplicando metodologias de análise de diversidade genética, em nível de DNA, pode auxiliar a interpretar dados de estudos que utilizam cães como modelo para terapias e doenças

humanas, beneficiando tanto animais quanto seres humanos. Além disso, a obtenção de dados de seqüenciamento do gene *cyp2d15* em canídeos servirá de base para estudos funcionais, que podem auxiliar áreas como a medicina da conservação permitindo uma melhor caracterização das diferenças no biometabolismo de drogas e poluentes ambientais entre cães e canídeos selvagens.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

2.1 Os objetivos gerais foram:

- Caracterizar o gene *cyp2d15* em vinte e uma (21) raças caninas puras;
- Caracterizar o gene *cyp2d15* em quatro (4) espécies de canídeos selvagens cativos sul-americanos: *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*.

2.2 Os objetivos específicos foram:

- Desenhar e testar oligonucleotídeos iniciadores para os onze exons do gene *cyp2d15* de cães e outros canídeos;
- Investigar a existência de polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) no gene *cyp2d15* através da técnica de seqüenciamento;
- Verificar a conservação do gene *cyp2d15* entre diferentes raças caninas e diferentes espécies de canídeos.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 AS ENZIMAS DO BIOMETABOLISMO

Estudos indicam que cada indivíduo possui um padrão genético característico, composto por alelos codificadores das chamadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e dos receptores responsáveis pela regulação das mesmas (RSBC/BR, 2000). Estas enzimas metabolizadoras de substâncias estranhas ao organismo, enzimas de biotransformação, são responsáveis pelo reconhecimento e pela conversão de compostos em formas solúveis em água (hidrofílicas). Esse metabolismo é feito em duas etapas:

- Fase I: Ao entrar na célula o xenobiótico é metabolizado através de uma reação de oxidação que introduz um centro eletrofílico na molécula.
- Fase II: A criação do centro reativo permite que as enzimas de fase II conjuguem o metabólito eletrofílico com várias moléculas endógenas resultando em um metabólito hidrofílico eliminado através da urina e do bolo fecal.

A toxicidade pode diminuir ou aumentar durante a fase de metabolização. Quando aumenta ocorre especialmente após a reação de fase I. Pode ocorrer a formação de ligações covalentes com a molécula de DNA e a produção de adutos. As consequências biológicas dependem do tipo de aduto e da localização no DNA. Assim, mutações nos genes que codificam enzimas de biotransformação resultam em fenótipos com maior ou menor capacidade de metabolização e detoxificação e estão incluídos entre os genes de suscetibilidade (SILVA *et al.*, 2003).

### 3.2 POLIMORFISMOS NOS GENES DE FASE I

As enzimas de fase I, que são principalmente enzimas da superfamília do Citocromo P450 (CYPs), ativam vários procarcinógenos ambientais pela adição ou exposição de seus grupos funcionais. Estas enzimas atuam em vários substratos diferentes e algumas delas são induzidas por fatores ambientais (HUNG *et al.*, 1997). São mono-oxigenases que catalisam muitas reações envolvidas no metabolismo de drogas e síntese do colesterol, esteróides e outros lipídeos (NCBI, 2007). Muitos dos 63 genes *CYP* são polimórficos em humanos (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 1999; NELSON, 1999; ORPHANIDES & KIMBER, 2003), e a relevância clínica do polimorfismo já tem sido muito estudada, principalmente isoenzimas farmacologicamente importantes como a CYP2A6 (NUNOYA *et al.*, 1999), CYP2C9 (SULLIVAN-KLOSE *et al.*, 1996), CYP2C19 (FURUTA *et al.*, 1999) e CYP2D6 (MEYER *et al.*, 1986; KAGIMOTO *et al.*, 1990). Os membros da super-família CYP são agrupados nos inúmeros membros dessa enorme super-família, seis são responsáveis pelo metabolismo da vasta maioria dos fármacos (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4). Além do metabolismo de vários quimioterápicos, as enzimas CYP também participam no metabolismo de carcinógenos.

No cão o gene *cyp2d15* é chamado citocromo *P450 dut2*, ortólogo ao *CYP2D6* humano e se localiza no cromossomo 10 e é composto por 11 exons 1383pb (FIGURA 02). Ele A seqüência protéica já está completamente seqüenciada e é composta por 500 aminoácidos. Esta proteína possui alta atividade na hidroxilação do bunitrolol e da imipramina e baixa atividade sobre a debrisoquina. Sua localização subcelular é na membrana periférica do reticulo endoplasmático e proteína da membrana periférica do microsomo. A metionina iniciadora está na posição um (1) e é removida, a cadeia é composta por 499 aminoácidos das posições 2 a 500, há um sítio de ligação a metal (ferro) chamado ligante axial heme na posição 446 (UNIPROT, 2009). Similarmente ao humano, o gene *cyp2d15* canino é expresso no fígado e apresenta níveis detectáveis também em vários outros tecidos (ROUSSEL *et al.*, 1998). Várias P450 humanas apresentam expressão polimórfica, principalmente a *CYP2D6*. Este polimorfismo é

primariamente caracterizado por dois fenótipos: indivíduos com a atividade normal da *CYP2D6* (metabolizadores rápidos - EMs) e indivíduos com diminuição dessa atividade (metabolizadores lentos - PMs). A etiologia genética para esses fenótipos incluem deleções gênicas, mutações de ponto e variantes de recomposição alternativa (GOUGH *et al.*, 1990). Células que expressam *cyp2d15* purificadas ou COS exibiram atividade catalítica similar às atribuídas ao *CYP2D6* (ex., desipramina 2-hidroxilase, metoprolol a-hidroxilase e dextrometorfano O-desmetilase). O *cyp2d15* foi expresso em células Sf9 de inseto utilizando baculovírus recombinante e foi mostrado que esse gene possui uma atividade adicional, em relação ao *CYP2D6*, sobre os substratos imipramina e bunitrolol (ROUSSEL *et al.*, 1998).



FIGURA 01 - CANÍDEOS SUL-AMERICANOS: CACHORRO-DO-MATO, CACHORRO-VINAGRE, LOBO-GUARÁ E GRAXAIM-DO-CAMPO, DA ESQUERDA PARA A DIREITA (*Cerdocyon thous*, *Speothos venaticus*, *Chrysocyon brachyurus* e *Lycalopex gymnocercus*).

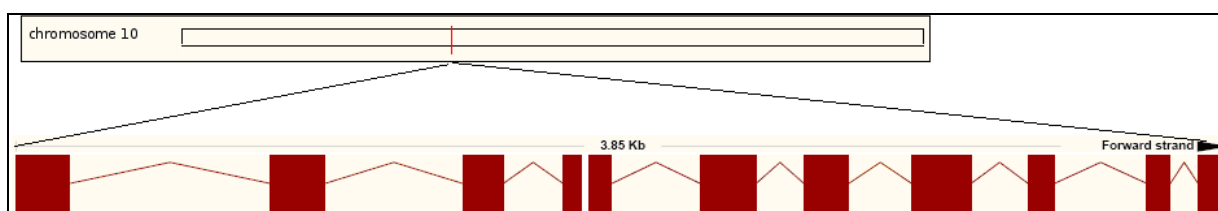


FIGURA 02 - LOCALIZAÇÃO NO CROMOSSOMO 10 DO GENE *cyp2d15* EM *CANIS FAMILIARIS* (FONTE:WWW.ENSEMBL.ORG).

Até agora, várias isoformas *CYP* caninas já foram identificadas através de clonagem e técnicas de seqüenciamento, cinco delas já foram reportadas como geneticamente polimórficas (KAMIMURA, 2006). São elas, a *Cyp2b11* (DUIGNAN *et al.*, 1987), a *Cyp3a12* (CIACCO & HALPERT, 1989), a *Cyp1a1/2* (OHTA *et al.*, 1989), *Cyp2c21* (UCHIDA *et al.*, 1990) e a *cyp2d15* (SAKAMOTO *et al.*, 1995). Até pouco

tempo, pouco se sabia a respeito dos polimorfismos diretamente associados com a alteração na metabolização de xenobióticos (KAMIMURA, 2006).

### 3.3. POLIMORFISMOS NOS GENES DE FASE II

As reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) através das Glutathiona-S-Transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem então como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (NEBERT, 1991; PERSSON *et al.*, 1995). Assim, o equilíbrio entre as enzimas que aumentam a toxicidade ou inativam os produtos químicos pode conferir suscetibilidade individual diferenciada (ALBERTINI, 1999). As enzimas de fase II, inclusive as GST, N-acetil transferase e epóxido hidrolase, estão envolvidas na detoxificação de metabólitos carcinogênicos.

As formas citosólicas e ligadas à membrana das glutathionas S-transferases são codificadas por duas famílias de genes distintas. Até o momento, oito classes distintas de glutathionas S-transferases de mamíferos, solúveis no citoplasma, já foram identificadas: *alfa*, *kapa*, *mi*, *ômega*, *pi*, *sigma*, *teta* e *zeta*. O gene *GSTM1* codifica uma glutathiona S-transferase que pertence à classe *mi*. Esta classe de enzimas tem função de detoxificação de componentes eletrofílicos, incluindo carcinógenos, medicamentos, toxinas ambientais e produtos do estresse oxidativo, através de sua conjugação com a glutathiona. Os genes codificadores da classe de enzimas *mi* estão organizados em um grupo de genes localizado no cromossomo humano (1p13.3) e são altamente polimórficos. Estas variações genéticas podem alterar a suscetibilidade de um indivíduo aos carcinógenos e toxinas assim como podem afetar a toxicidade e eficácia de certas drogas. Alelos com atividade nula por deleção nesta classe de genes têm sido associadas a um aumento no número de cânceres, devido a maior suscetibilidade a toxinas ambientais e carcinógenos. Isoformas múltiplas de proteínas são codificadas por variações deste gene. O genótipo nulo do *GSTM1* apresenta uma capacidade diminuída na detoxificação de alguns carcinógenos presentes na fumaça do cigarro.

Isto tem sido relacionado com o aumento no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão, bexiga, laringe, cólon, câncer múltiplo de pele, melanoma e câncer bucal (NCBI, 2007).

O gene *GSTT1* codifica uma glutathione S-transferase que pertence à classe *teta*, que catalisa a conjugação da glutathione reduzida com uma variedade de componentes eletrofílicos e hidrofóbicos. Esta classe inclui o *GSTT1* e o *GSTT2*, eles compartilham 55% da sequência de aminoácidos e ambos parecem possuir papel importante na carcinogênese humana. O gene *GSTT1* localiza-se a uma distância aproximada de 50 kb do *GSTT2*. Ambos apresentam estruturas similares, sendo compostos de 5 exons com ligações idênticas exon/intron (NCBI, 2007).

O gene *GSTT1* também chamado de LOC 477556, está localizado no cromossomo canino 26, o gene *GSTT2* também chamado de LOC 477556, está localizado no cromossomo canino 26 e o gene *GSTM1* chamado de LOC 479912, no cromossomo canino 6 e são ortólogos respectivamente aos *GSTT1* e *GSTM1* humanos (NCBI, 2007). Até onde se sabe, estes genes não estão bem estudados em cães.

### 3.4 POLIMORFISMOS GENÔMICOS E RESPOSTA TOXICOLÓGICA

O metabolismo inicial de drogas e outros compostos químicos externos é realizado predominantemente pela família de enzimas do citocromo P450 (CYP) (DANIELSON, 2002). A constatação que muitos dos 63 genes *CYP* são polimórficos em seres humanos indica a existência de diferenças inter-individuais na resposta aos xenobióticos (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 1999). Os polimorfismos do gene *CYP2D6* humano têm sido intensamente estudados. A enzima codificada por ele é necessária ao metabolismo de mais de 25% das drogas comercialmente disponíveis e acredita-se que também, a uma proporção similar de agentes químicos ambientais (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 1999). Já foi reportado em humanos que as alterações nos níveis ou atividade da enzima devido a polimorfismos causam a incapacidade de metabolizar e excretar certas drogas o que pode resultar em efeitos colaterais. Outros

polimorfismos resultam em um aumento das enzimas CYP2D6, por amplificação gênica por exemplo eliminando a droga tão rapidamente do organismo que os níveis terapêuticos desejados não são alcançados com doses normais (JOHANSSON *et al.*, 1993). Os cães são freqüentemente utilizados em estudos farmacológicos. Polimorfismos em genes metabolizadores de fármacos ou relacionados à distribuição destes no organismo já foram reportados em algumas raças. Já se sabe que alguns Collies (30–40%) são extremamente susceptíveis à neurotoxicidade induzida por ivermectina, um antiparasitário semi-sintético. Este fenômeno se deve a uma mutação por deleção no gene *mdr1*, da P-glicoproteína madura, que por sua vez faz com que a ivermectina não sofra extrusão do tecido cerebral para o sangue (MEALEY *et al.* 2001). Outro exemplo é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) da tiopurina S-metiltransferase em cães domésticos que está associada à atividade reduzida dessa enzima e, conseqüentemente, uma séria toxicidade relacionada à tiopurina (SALAVAGGIONE *et al.*, 2002). Variações na atividade da *Cyp1a2* (devido a diferenças na expressão enzimática) já foram reportadas em Beagles onde diferenças na metabolização resultaram em alterações significativas na hidroxilação de um novo benzodiazepínico (MISE *et al.*, 2004). Em Greyhound já foi reportada a deficiência do gene *Cyp2b11*, ortólogo ao *CYP2B6* humano, responsável por diferentes níveis de hidroxilação do propofol (ZORAN *et al.*, 1993). Variações farmacogenéticas significativas no metabolismo do fármaco celecoxib já foram reportadas no gene *cyp2d15* em Beagles puros (PAULSON *et al.*, 1999). Em Bedlington Terrier hepatopatias relacionadas ao armazenamento de cobre devido a mutações no gene *murr-1* já foram relatadas. A doença, autossômica recessiva, causa hepatite crônica resultante do defeito primário na excreção do cobre dos hepatócitos e pode afetar a metabolização de drogas pelo fígado (CORONADO *et al.*, 2003; HYUN *et al.*, 2004). Hay Kraus e colaboradores relataram a sensibilidade à acepromazina em Boxers (2000). Estes são exemplos que demonstram como a resposta toxicológica a determinadas drogas são potencializadas pelos polimorfismos genéticos.

### 3.5 VISÃO GERAL DO TERMO RAÇA

Uma raça é definida como um grupo de organismos que compartilham um ancestral comum e certas características diferenciadas desenvolvidas pela seleção artificial e mantidas através da propagação controlada (*The American Heritage Dictionary of the English Language*, 2000). Entre os animais domésticos, algumas das maiores diversidades físicas podem ser encontradas entre as raças caninas. Existem mais de 400 raças reconhecidas mundialmente e 156 são registradas pelo *American Kennel Club*. Alguns trabalhos indicam que algumas raças caninas são mais proximamente relacionadas que outras (PARKER & OSTRANDER, 2005). Um diagrama da árvore da família canina é apresentado na FIGURA 03.

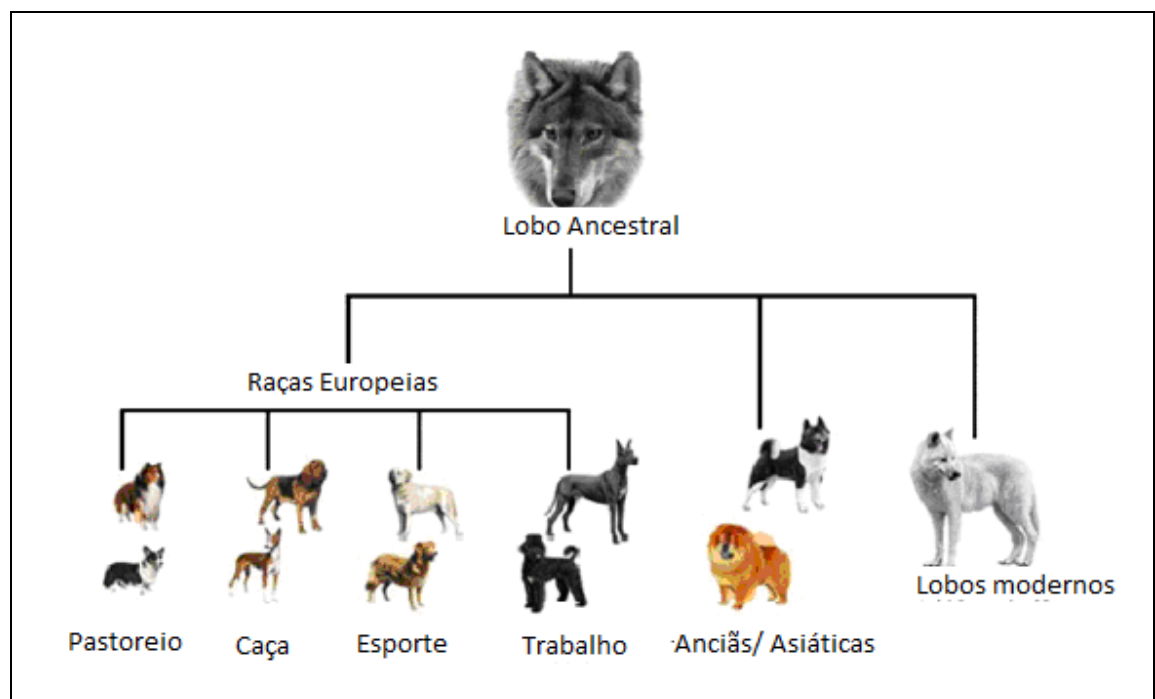


FIGURA 03 - ÁRVORE DA HISTÓRIA CANINA  
FONTE: FLEISCHER *et al.*, 2008 .

### 3.6 MODELO ANIMAL CANINO

Durante o desenvolvimento de fármacos, o acesso à segurança é tipicamente baseado em dados toxicológicos provenientes de uma espécie murina e uma não murina. Um trabalho realizado por OLSON *et al.* (2000) demonstrou que estudos em não roedores foram mais preditivos da toxicidade em humanos que em roedores. Apesar de que os achados toxicológicos pré-clínicos foram observados com frequência em ambos cão e rato, a espécie canina mostrou uma maior concordância com os humanos quando as toxicidades foram observadas em apenas uma dessas espécies. Em geral, os dados toxicológicos obtidos de estudos caninos demonstraram um bom potencial para prever toxicidades humanas para várias classes terapêuticas, contudo algumas toxicidades observadas em cães não têm risco relevante para seres humanos (OLSON *et al.*, 1998).

### 3.7 SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER EM CÃES

O câncer é uma das principais causas de morte em humanos com menos de 85 anos e de morte por doença em cães. Por este motivo tem ganhado uma importância excepcional na nossa sociedade (MODIANO *et al.*, 2005). A cada ano, cresce o número de pessoas e de animais domésticos acometidos por algum tipo de neoplasia. O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos. A interferência do homem nos hábitos alimentares dos animais e no seu ambiente também os coloca sob o mesmo risco, sendo possivelmente a causa das frequências de algumas neoplasias serem equivalentes (MOULTON, 1990). Fatores como etnia, sexo, idade, estado nutricional e de saúde, influenciam as taxas de incidência e mortalidade por câncer em humanos (PERERA, 2000).

O câncer canino está caracterizado por crescimento tumoral de ocorrência espontânea em longos períodos sem acometimento do sistema imunológico, com



heterogeneidade intra e intertumoral, além do desenvolvimento de recidiva e metástases. Portanto nota-se similaridade entre o câncer humano e canino não descrita em outros modelos animais (KHANNA *et al.*, 2006; MODIANO *et al.*, 2006). Esse risco pareado com a grande população (mais de 70 milhões só nos Estados Unidos) resulta em altas taxas de câncer que possibilitam experimentos clínicos, inclusive testes de novos medicamentos. Outras vantagens do estudo em cães são: a possibilidade de repetições de coletas, a resposta terapêutica comparável a dos humanos e a criação por longos períodos até atingirem idades de risco para o câncer, possibilitando experimentos clínicos e testes de novos medicamentos (KHANNA *et al.*, 2006).

Estima-se que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (PERERA, 2000). Algumas características genéticas demonstram uma forte interação com o meio ambiente no processo carcinogênico. Outras podem influenciar o número de células alvo, a proliferação das células tronco acometidas, as taxas nas quais o primeiro e o segundo evento mutacional ocorrem ou a ocorrência de eventos críticos para a progressão e metástase, como a vascularização do tumor (TRIZNA & SCHANTZ, 1998). Há cerca de trinta anos, a suscetibilidade ao câncer era principalmente atribuída aos níveis de exposição aos carcinógenos. Atualmente, embora essa correlação seja efetiva, é evidente a existência de inúmeros fatores biológicos responsáveis pela variabilidade individual, relevantes em várias doenças. Estudos indicam que cada indivíduo possui um padrão genético característico, composto por alelos codificadores das chamadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e dos receptores responsáveis pela regulação das mesmas (RSBC/BR, 2000). Alguns dos produtos de genes das enzimas ativadoras de procarcinógenos já foram detectados em tumores humanos através de imunohistoquímica, como do *CYP1A1* e do *CYP1B1* (SPINK *et al.*, 1998).

Os tumores da glândula mamária de cães têm interesse especial para os pesquisadores que trabalham com neoplasias devido às similaridades com o câncer de mama humano. Foi demonstrado que as neoplasias mamárias de cães apresentam o

fenótipo antigênico comparável àquele observado em lesões de mama em homens e mulheres (MOTTOLESE *et al.*, 1994) e há homologia entre os genes *BRCA1* humano e do cão (SZABO *et al.*, 1996). Tem sido proposto, em muitos trabalhos, o estudo dessas lesões na espécie canina como modelo comparativo para a espécie humana (SCHNEIDER, 1970; STRANDBERG & GOODMAN, 1974; PELETEIRO, 1994). A grande maioria das doenças monogênicas caninas nas quais foram identificadas mutações de ponto ocorre em genes ortólogos ao responsável pela doença humana correspondente (HENTHORN *et al.*, 2000). Em cães, estas neoplasias ocorrem quase que exclusivamente em fêmeas, mas machos com hiperestrogenismo decorrente de sertolioma também podem ser acometidos (MEUTEN, 2002). DORN *et al.* (1968) encontraram uma associação positiva significativa entre tumores de mama e o estado hormonal intacto em fêmeas caninas. Todas as raças de cães podem ser afetadas, mas algumas aparecem com alta prevalência, como as raças Poodle, Dachshund, Pointer e Retrievers (MISDORP *et al.*, 1990; RUTTEMAN *et al.*, 2001). ZATLOUCAL *et al.* (2005) relataram que as raças Poodle, Cocker Spaniel Inglês e Dachshund apresentaram um maior risco relativo estatisticamente significativo de desenvolver tumores mamários benignos e malignos, mas não conseguiram demonstrar o mesmo para as raças Setter Irlandês, Labrador Retriever e Boxer. Raças caninas puras, em geral, apresentam uma taxa de risco duas vezes mais alta de desenvolver câncer de mama do que cães mestiços da mesma idade (DORN *et al.*, 1968).

A farmacogenética apresenta possibilidades bastante promissoras para o aprimoramento da terapia do câncer, i.e., redução da toxicidade e elevação da eficácia, através da otimização da escolha do tratamento mais adequado, individualização de doses e descoberta de novos alvos. Em diversos casos essa estratégia não é mais promessa, já influenciando decisões clínicas. Alguns dos complicadores que necessitarão ser abordados num futuro próximo decorrem do fato de que desde a absorção e metabolismo/disposição até a resposta à terapia alvo-seletiva sofrem influência de múltiplos genes. Isso exigirá, para a otimização do uso dos agentes terapêuticos, a análise simultânea de vários genes e vias metabólicas e a criação de modelos de análise complexos que integrem todas essas informações. A individualização da terapia com base em variações genéticas que alterem qualitativa ou

quantitativamente a função de genes específicos é um pouco mais fácil quando essas variações são germinativas (polimorfismo genético). Quando a variação decorre de mutações somáticas a dificuldade aumenta, visto que a análise genômica depende da obtenção de amostras de tecidos tumorais. Para atingir esse estágio serão necessários estudos de genômica funcional que contribuam para a compreensão da biologia tumoral e determinação da relevância das alterações genéticas para a progressão da doença ou para resposta à terapia. O agente terapêutico ideal seria aquele que fosse eficaz como monoterapia atuando sobre um alvo comum a diversos tumores.

### 3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A recente finalização da seqüência do genoma canino permite a análise da conservação de genes e proteínas que podem servir como alvo para abordagens moleculares ou personalizadas de tratamentos de diversas doenças. Acredita-se que cada vez mais os estudos em cães serão padrão para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças crônicas e até mesmo o câncer, assim como determinarão tratamentos com maior probabilidade de sucesso em humanos. O melhor conhecimento sobre a variação em genes do biometabolismo importantes, como o *cyp2d15*, apresentam relevância para uma melhor compreensão da farmacocinética de diversos medicamentos que poderão ser úteis para os seres humanos. Esses tratamentos também beneficiarão a população de animais de estimação trazendo mercados para os fabricantes de novos medicamentos e terapias (MODIANO *et al.*, 2006). Além disso, a obtenção destes dados permitirá a melhor caracterização das diferenças no biometabolismo de drogas e poluentes ambientais entre cães e canídeos selvagens.

## REFERÊNCIAS

AKC: American Kennel Club. Disponível em: [http://www.akc.org/reg/dogreg\\_stats.cfm](http://www.akc.org/reg/dogreg_stats.cfm)  
Acesso em 2 de junho de 2010.

ALBERTINI, R. J. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. **Mutation Research**, 428: 217-226, 1999.

ANTUOFERMO, E.; MILLER, M.A.; PIRINO, S.; XIE, J.; BADVE, S.; MOHAMMED, S. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs—a model of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers**.16:2247–2256, 2007.

BROAD: *BROAD Institute of MIT and Harvard*. Disponível em: <http://www.broad.mit.edu>.  
Acesso em 18 de fevereiro de 2007.

CIACCO, P. J.; HALPERT, J. R. Characterization of a phenobarbital-inducible dog liver cytochrome P450 structurally related to rat and human enzymes of the P450IIIA (steroid-inducible) gene subfamily. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 271:284–299, 1989.

CORONADO, V. A.; DAMARAJU, D.; KOHIJOKI, R.; COX, D. W. New haplotypes in the Bedlington terrier indicate complexity in copper toxicosis. **Mammalian Genome**, 14:483–91, 2003.

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution, and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, 3:561–597, 2002.

DORN, C. R.; TAYLOR, D. O.; SCHNEIDER, R.; HIBBARD, H. H.; KLAUBER, M. R. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. II. cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. **Journal of the National Cancer Institute**, 40: 307-318, 1968.

DUIGNAN, D. B.; SIPES, I. G.; LEONARD, T. B.; HALPERT, J. R. Purification and Characterization of the dog hepatic cytochrome P450 isozyme responsible for the metabolism of 2,2',4,4',5,5' hexachlorobiphenil. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 255:290–303, 1987.

ENSEMBL: Genome Browser . Disponível em: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org). Acesso em 14 de junho de 2010.

FLEISCHER, S.; SHARKEY, M.; MEALEY, K.; OSTRANDER, E. A., AND MARTINEZ, M. Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. **The AAPS Journal**, 10(1): 110-119, 2008.

FURUTA, T.; OHASHI, K.; KOSUGE, K. *et al.* CYP2C19 genotype status and effect of omeprazole on intragastric pH in humans. **Clinical pharmacology and therapeutics**, 65:552-61, 1999.

GOUGH, A. C.; MILES, J. S.; SPURR, N. K.; MOSS, J. E.; GAEDIGK, A.; EICHELBAUM, M.; WOLF, C. R. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. **Nature** 347: 773–776. 1990

HAY KRAUS, B. L.; GREENBLATT, D. J.; VENKATAKRISHNAN, K.; COURT, M. H. Evidence for propofol hydroxylation by cytochrome P450B11 in canine liver macrodomes: breed and gender differences. **Xenobiotica** 30L:575–588, 2000.

HENTHORN, P. S.; LIU, J.; GIDALEVICH, T.; FANG, J.; CASAL, M. L.; PATTERSON, D. F.; GIGER, U. Canine cystinuria: polymorphism in the canine SLC3A1 gene and identification of a nonsense mutation in cystinuric Newfoundland dogs. **Human Genetics**, 107: 295–303, 2000.

HOUGHTON, M. The American heritage dictionary of the English language, 4<sup>th</sup> ed., Mifflin Company, Boston, MA, 2000.

HUNG, H. C.; CHUANG J.; CHIEN, Y. C.; CHERN, H. D.; CHIANG, C. P.; KUO, Y. S.; HILDESHEIM, A.; CHEN, C. J. Genetic polymorphisms of *CYP2E 1*, *GSTM1*, and *GSTT1*; environmental factors and risk of oral cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 6: 901-905, 1997.

HYUN, C.; LAVULO, L. T.; FILIPPICH, L. J. Evaluation of haplotypes associated with copper toxicosis in Bedlington Terriers in Australia. **American Journal of Veterinary Research**, 65:1573–1579, 2004.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, 20:342–349, 1999.

JOHANSSON, I.; LUNDQVIST, E.; BERTILSSON, L.; DAHL, M. L.; SJOQVIST, F.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 90:11825–11829, 1993.

KAGIMOTO, M.; HEIM, M.; KAGIMOTO, K.; ZEUGIN, T.; MEYER, U.A. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (*CYP2D6*) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. **The Journal of Biological Chemistry**, 265(28):17209-17214. 1990.

KAMIMURA, H. Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. **Archives of Toxicology**, 80: 732–738, 2006.

KHANNA, C.; LINDBLAD-TOH, K.; VAIL, D.; LONDON, C.; BERGMAN, P.; BARBER, L.; BREEN, M.; KITCHELL, B.; MCNEIL, E.; MODIANO, J.F.; NIEMI, S.; COMSTOCK, K.E.; OSTRANDER, E.; WESTMORELAND, S.; WITHROW, S. The dog as a cancer model. **Nature Biotechnology**, 24: 1065-1066, 2006

LINDBLAD, K.; WADE, M. C.; MIKKELSEN, S. T.; KARLSSON, K. E.; JAFFE, B. D. KAMAL, M. CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULBOKAS, E. J.; ZODY, M. C.; MAUCELI E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A.; PONTING, C. P.; GALIBERT, F.; SMITH, D. R.; DEJONG, P. J.; KIRKNESS, E.; ALVAREZ, P.; BIAGI, T.; BROCKMAN, W.; BUTLER, J.; CHIN, C. W.; COOK, A.; CUFF, J.; DALY, M. J.; DECAPRIO, D.; GNERRE, S.; GRABHERR, M.; KELLIS, M.; KLEBER, M.; BARDELEBEN, C.; GOODSTADT, L.; HEGER, A.; HITTE, C.; KIM, L.; KOEPFLI, K. P.; PARKER, H. G.; POLLINGER, J. P.; SEARLE, S. M.; SUTTER, N. B.; THOMAS, R.; WEBBER, C.; BALDWIN, J.; ABEBE, A.; ABOUELLEIL, A.; AFTUCK, L.; AIT-ZAHRA, M.; ALDREDGE, T.; ALLEN, N.; AN, P.; ANDERSON, S.; ANTOINE, C.; ARACHCHI, H.; ASLAM, A.; AYOTTE, L.; BACHANTSANG, P.; BARRY, A.; BAYUL, T.; BENAMARA, M.; BERLIN, A.; BESSETTE, D.; BLITSHTeyN, B.; BLOOM, T.; BLYE, J.; BOGUSLAVSKIY, L.; BONNET, C.; BOUKHGALTER, B.; BROWN, A.; CAHILL, P.; CALIXTE, N.; CAMARATA, J.; CHESHATSANG, Y.; CHU, J.; CITROEN, M.; COLLYMORE, A.; COOKE, P.; DAWOE, T.; DAZA, R.; DECKTOR, K.; DEGRAY, S.; DHARGAY, N.; DOOLEY, K.; DOOLEY, K.; DORJE, P.; DORJEE, K.; DORRIS, L.; DUFFEY, N.; DUPES, A.; EGBIREMOLEN, O.; ELONG, R.; FALK, J.; FARINA, A.; FARO, S.; FERGUSON, D.; FERREIRA, P.; FISHER, S.; FITZGERALD, M.; FOLEY, K.; FOLEY, C.; FRANKE, A.; FRIEDRICH, D.; GAGE, D.; GARBER, M.; GEARIN, G.;

GIANNOUKOS, G.; GOODE, T.; GOYETTE, A.; GRAHAM, J.; GRANDBOIS, E.; GYALTSEN, K.; HAFEZ, N.; HAGOPIAN, D.; HAGOS, B.; HALL, J.; HEALY, C.; HEGARTY, R.; HONAN, T.; HORN, A.; HOUDE, N.; HUGHES, L.; HUNNICUTT, L.; HUSBY, M.; JESTER, B.; JONES, C.; KAMAT, A.; KANGA, B.; KELLS, C.; KHAZANOVICH, D.; KIEU, A. C.; KISNER, P.; KUMAR, M.; LANCE, K.; LANDERS, T.; LARA, M.; LEE, W.; LEGER, J. P.; LENNON, N.; LEUPER, L.; LEVINE, S.; LIU, J.; LIU, X.; LOKYITSANG, Y.; LOKYITSANG, T.; LUI, A.; MACDONALD, J.; MAJOR, J.; MARABELLA, R.; MARU, K.; MATTHEWS, C.; MCDONOUGH, S.; MEHTA, T.; MELDRIM, J.; MELNIKOV, A.; MENEUS, L.; MIHALEV, A.; MIHOVA, T.; MILLER, K.; MITTELMAN, R.; MLENGA, V.; MULRAIN, L.; MUNSON, G.; NAVIDI, A.; NAYLOR, J.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NGUYEN, C.; NGUYEN, T.; NICOL, R.; NORBU, N.; NORBU, C.; NOVOD, N.; NYIMA, T.; OLANDT, P.; O'NEILL, B.; O'NEILL, K.; OSMAN, S.; OYONO, L.; PATTI, C.; PERRIN, D.; PHUNKHANG, P.; PIERRE, F.; PRIEST, M.; RACHUPKA, A.; RAGHURAMAN, S.; RAMEAU, R.; RAY, V.; RAYMOND, C.; REGE, F.; RISE, C.; ROGERS, J.; ROGOV, P.; SAHALIE, J.; SETTIPALLI, S.; SHARPE, T.; SHEA, T.; SHEEHAN, M.; SHERPA, N.; SHI, J.; SHIH, D.; SLOAN, J.; SMITH, C.; SPARROW, T.; STALKER, J.; STANGE-THOMANN, N.; STAVROPOULOS, S.; STONE, C.; STONE, S.; SYKES, S.; TCHUINGA, P.; TENZING, P.; TESFAYE, S.; THOULUTSANG, D.; THOULUTSANG, Y.; TOPHAM, K.; TOPPING, I.; TSAMLA, T.; VASSILIEV, H.; VENKATARAMAN, V.; VO, A.; WANGCHUK, T.; WANGDI, T.; WEIAND, M.; WILKINSON, J.; WILSON, A.; YADAV, S.; YANG, S.; YANG, X.; YOUNG, G.; YU, Q.; ZAINOUN, J.; ZEMBEK, L.; ZIMMER, A.; LANDER, E. S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, 438: 803-819, 2005.

MEALEY, K.L.; BENTJEN, S.A.; GAY, J.M.; CANTOR, G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, 11(8):727-33, 2001.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic dogs**. 4. ed. Iowa State: Univer. Califórnia, 788. 2002.

MEYER, U. A.; GUT, J.; KRONBACH, T.; SKODA, C.; MEIER, U. T., CATIN, T. The molecular mechanisms of two common polymorphisms of drug oxidation--evidence for functional changes in cytochrome p450 isozymes catalysing bufuralol and mephenytoin oxidation. **Xenobiotica**, 16:449-464, 1986.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **World Health Organization**, 7: 59. 1999.

MISE, M.; YADERA, S.; MATSUDA, M.; *et al.* Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, 32:240–245, 2004.

MODIANO, J. F.; BREEN, M.; BURNETT, R. C.; PARKER, H.G.; INUSAH, S.; THOMAS, R.; AVERY, P.R. *et al.* Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risks. **Cancer Research**, 65: 5654-5661. 2005.

MODIANO, J.F.; BREEN, M.; LANA, S.E.; EHRHART, N.; FOSMIRE, S.P.; THOMAS, R.; JUBALA, C.M.; KOZICKI, A.R.; EHRHART, E.J.; SCHAACK, J.; DUKE, R.C.; CUTTER, G.R.; BELLGRAU, D. Naturally occurring translational models for development of cancer gene therapy. **Gene Therapy and Molecular Biology**, 10: 31-40, 2006.

MOTTOLESE, M.; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCJARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, P.G. Spontaneous canine mammary tumors. **Laboratory Investigation**, 2: 182-187, 1994.

MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California, 672. 1990.

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information*. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em 18 de fevereiro de 2007.

NEBERT, D.W. Role of Genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutation Research**, 247: 267-281, 1991.

NHGRI: *National Human Genome Research Institute*. Disponível em: [www.genome.gov](http://www.genome.gov). Acesso em 12 de março de 2007.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 and the individuality of species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 369(1):1-10, 1999.

NUNOYA, K.; YOKOI, T.; TAKAHASHI, Y.; KIMURA, K.; KINOSHITA, M.; KAMATAKI, T. Homologous unequal cross-over within the human CYP2A gene cluster as a mechanism for the deletion of the entire CYP2A6 gene associated with the poor metabolizer phenotype. **The Journal of Biochemistry**, 126(2):402-7, 1999.



OHTA, K.; MOTOYA, M.; KOMORI, M.; MIURA, M.; KITADA, M.; KAMATAKI, T. Interspecies homology of cytochrome P450 purification and toxicological significance of a high spin form cytochrome P450 (P450-D2) from liver microsomes of polychlorinated biphenyl (PCB)-treated beagle dogs. **Biochemical Pharmacology**, 38:91–96, 1989.

OLSON, H.; BETTON, G.; STRITAR, J.; ROBINSON, D. The predictivity of the toxicity of pharmaceuticals in humans from animal data – an interim assessment. **Toxicology Letters**, 102:535-538, 1998.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 32:56-67, 2000.

ORPHANIDES, G.; KIMBER, I. Toxicogenetics: applications and opportunities. **Toxicological Sciences**, 75:1-6, 2003.

PARKER, H.G.; OSTRANDER, E.A. Canine genomics and genetics: running with the pack. **PLoS Genetics**, 1(5):507-511, 2005.

PAULSON, S. K.; ENGEL, L.; REITZ, B.; *et al.* Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase inhibitor, celcoxib. **Drug Metabolism and Disposition**, 27:1133–1142, 1999.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 89: 10-34, 1994.

PERERA, F.P.; WEINSTEIN, I.B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. **Carcinogenesis**, 21: 517-524, 2000.

PERSSON, T.; JOHANSSON, T.; BERGLING, H.; MARJA-LIISA, D.; SEIDEGAD, J. *et al.* Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 7: 25-36, 1995.

REIMANN, N.; BARTNITZKE, S.; NOLTE, I.; BULLERDIEK, J. Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description. **The American Genetic Association**, 90: 31-34, 1999.

ROUSSEL, F.; DUIGNAN, D. B.; LAWTON, M. P.; OBACH, R.; STRICK, C. A.; TWEEDIE, D. J. Expression and characterization of canine cytochrome P450 2D15\*1. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 357(1)27-36, 1998.

RSBC: Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia. Disponível em <[www.rbscancer.com.br](http://www.rbscancer.com.br)> Acesso em 14 de março de 2007.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. Small Animal Clinical Oncology 2.ed. Philadelphia : Sanders, 455-477, 2001.

SAKAMOTO, K.; KIRITA, S.; BABA, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZOE, Y.; KATO, R.; TAKANAKA, A.; MATSUNABA, T. A new cytochrome P450 form belonging to the CYP2D in dog liver microsomes: purification, cDNA cloning and enzyme characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 319:372–382, 1995.

SALAVAGGIONE, O.E.; KIDD L, PRONDZINSKI, J.L., SZUMLANSKI, C.L.; SHANE PANKRATZ, V.; WANG, L.; TREPANIER, L.; WEINSHILBOUM, R.M. Canine red blood cell thiopurine s-methyltransferase: companion animal pharmacogenetics. **Pharmacogenetics**, 12:713-724, 2002

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast câncer. **Cancer**, 2: 189-191, 1970.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A. **Genética toxicológica**. Editora Alcance. 2003.

SPINK, C.D.; SPINK, C.B.; CAO, Q.J.; DEPASQUOALE, A.J.; PENTECOST, T.B.; FASCO, J.M.; LI, Y.; SUTTER, R.T. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. **Carcinogenesis**, 2: 291–298, 1998.

STRANDBERG, J.D.; GOODMAN, D.G. Breast cancer – Animal model: canine mammary neoplasia. **American Journal of Pathology**, 75: 225-228, 1974.

SULLIVAN-KLOSE, T.H.; GHANAYEM, B.I.; BELL, D.A.; ZHANG, Z.Y.; KAMINSKY, L.S.; SHENFIELD, G.M.; MINERS, J.O.; BIRKETT, D.J.; GOLDSTEIN, J. A. The role of

the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. **Pharmacogenetics**, 6(4):341-349, 1996.

SZABO, C.; WAGNER, L.A.; FRANCISCO, L.V.; ROACH, J.C.; ARGONZA, R.; KING, M.C.; OSTRANDER, E.A. Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence among species. **Human Molecular Genetics**, 9: 1289- 1298, 1996.

TRIZNA, Z.; SCHANTZ, S. **Tobacco related cancers of the respiratory and upper digestive tract. In: Inherited susceptibility to cancer: clinical, predictive and ethical perspectives.** FOULKES, W.D and HODGSON, S.V (eds). Cambridge University Press, 1998.

UCHIDA, T.; KOMORI, M.; KITADA, M.; KAMATAKI, T. Isolation and cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs. **Molecular Pharmacology**, 38:644–651, 1990.

ZATLOUKAL, J.; LORENZOVA, J.; TICH, F.; NECAS, A.; KECOVA, H.; KOHOUT, P. Breed and age as risk factors for canine mammary tumors. **Acta Veterinaria Brunensis**, 74: 103-109, 2005

ZORAN, D. L.; RIEDESEL, D.H.; DYER, D. C. Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and Greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, 54:755–760, 1993.

UNIPROT: *Universal Protein Resource*. Disponível em: <http://www.uniprot.org>. Acesso em 12 de março de 2009.

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZAÇÃO DO GENE *cyp2d15* EM DIFERENTES RAÇAS CANINAS**

## RESUMO

Os modelos animais são muito utilizados no desenvolvimento pré-clínico de medicamentos a fim de prever o comportamento metabólico de novos compostos em humanos. Os genes da superfamília do citocromo *P450* (*CYP*) codificam enzimas que apresentam papel importante na metabolização de diversos substratos. Apesar da alta conservação dos genes *CYP* entre as espécies, ou seja, há relativamente poucas diferenças na seqüência primária de aminoácidos, até mesmo essas pequenas diferenças podem dar origem a mudanças significativas na especificidade ao substrato e na atividade catalítica destas enzimas. Os cães da raça Beagle são muito utilizados em estudos de acesso a segurança de novos candidatos a medicamentos, contudo há apenas um número limitado de estudos sobre a significância dos polimorfismos das isozimas *CYP* nessa e em outras raças. O presente estudo teve como objetivo principal investigar polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) no gene *cyp2d15* em 21 raças caninas puras. A investigação desses *SNPs* foi realizada utilizando-se a técnica de seqüenciamento, compreendendo oito exons e respectivas regiões flanqueadoras do referido gene. No presente estudo foram identificados cinco *SNPs* dos quais um foi sinônimo e os outros quatro não-sinônimos sendo que dois deles ainda não haviam sido descritos na literatura. As seqüências flanqueadoras analisadas apresentaram onze *SNPs* nos quatro introns estudados. Duzentas e sessenta (260) bases da seqüência intrônica entre os exons nove e dez ainda não disponibilizadas pelos bancos de dados públicos foram identificadas pelo seqüenciamento em quatro dos animais estudados. Os resultados obtidos são importantes para o entendimento da estrutura do gene *cyp2d15*. Além disso, a identificação de polimorfismos do gene em diferentes raças pode ajudar a guiar os estudos que buscam identificar animais com dificuldade de metabolização e, conseqüentemente, auxiliar na escolha de drogas que serão utilizadas no tratamento de uma série de doenças caninas e na subsequente utilização do cão como modelo animal para estudos farmacológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *cyp2d15*, seqüenciamento, raças caninas, polimorfismos genéticos

## ABSTRACT

Animal models are extensively used in the pre clinical development of new drugs to predict the metabolic behavior of new compounds in humans. The genes of the Cytochrome *P450* super family codify enzymes that have an important role in the metabolism of many substrates. Even though the *CYP* genes are highly conserved among species, in other words, there is relatively a few differences in the primary amino acids sequence, even these small differences can give rise to important substrate specificity and in the catalytic activity of these enzymes. Although the beagle is extensively used in the safety assessment studies of new drug candidates, only a limited number of studies have been reported on the significance of the *CYP* isozyme polymorphism in this and other breeds. The present study aims to investigate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *cyp2d15* gene in 21 pure canine breeds. To investigate these SNPs we used the sequencing technique of eight exons and flanking regions. In our study we found five SNPs, one synonymous and four non synonymous of which two not previously described in the current literature. The flanking regions analyzed presented eleven SNPs in the four studied introns. Two hundred sixty (260) base pair of the intronic sequence between exons nine and ten not available at public data banks were obtained in four of the animals studied. The results we obtained are very important to understand the structure of *cyp2d15*. Furthermore, the identification of breeds with metabolic difficulties can help the choice of the medicine used in the therapy of a series of canine diseases besides helping to characterize the dog as an animal model for pharmacologic studies.

**KEY-WORDS:** *cyp2d15*, sequencing, canine breeds, genetic polymorphisms

## 1. INTRODUÇÃO

A domesticação do cão a partir do lobo, seu ancestral, foi provavelmente o experimento genético mais complexo e certamente o mais extenso da história. A partir do lobo, o homem criou raças caninas com habilidades, personalidades e morfologia distintas (PARKER & OSTRANDER, 2005). Uma raça é definida como um grupo de organismos que compartilham um ancestral comum e certas características diferenciadas desenvolvidas pela seleção artificial e mantidas através da propagação controlada (HOUGHTON, 2000). A história disponível mostra que a maioria das raças existentes foi desenvolvida no século 19. Com a exceção de raças como o Greyhound e o Chow-chow, a criação da maioria das raças caninas é um evento recente (IRION *et al.*, 2003). A busca por machos populares, gargalos de garrafa populacionais e programas de cruzamentos estritos delineados para expandir populações com traços desejados levaram ao desenvolvimento do que hoje são as populações fechadas para cruzamentos, com heterogeneidade fenotípica e genética limitada, ideal para a disseminação genética de características complexas (PARKER & OSTRANDER, 2005). Essa pressão seletiva forte e focada inerente ao desenvolvimento de raças domésticas levou à perda de variação genética, sendo que algumas raças perderam potencialmente muito mais que outras dependendo de sua história e práticas de acasalamento (IRION *et al.*, 2003). Grande parte do genoma canino está disposta em longos segmentos contínuos que são compartilhados entre todos ou entre a maioria dos membros de uma mesma raça (SUTTER *et al.*, 2004). Há mais de 400 raças reconhecidas mundialmente e 163 raças reconhecidas pelo *American Kennel Club*, sendo que algumas raças mais populares contabilizam mais da metade dos registros (AKC, 2009).

Pelo seu peso apropriado e facilidade de manuseio (principalmente durante a coleta de sangue), os cães da raça Beagle são usados extensivamente para a criação e acesso da segurança de compostos químicos, contudo há apenas um número limitado de estudos sobre a significância dos polimorfismos das isoenzimas CYP em cães (KAMIMURA, 2006). A resposta toxicológica a determinadas drogas é potencializada

pelos polimorfismos genéticos, o que foi demonstrado pelos estudos com o gene *mdr1* da P-glicoproteína madura, que faz com que a ivermectina não sofra extrusão do tecido cerebral para o sangue em cães da raça Collie (MEALEY *et al.*, 2001), com o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) da tiopurina S-metiltransferase em cães domésticos que está associado a atividade reduzida dessa enzima e, conseqüentemente, uma séria toxicidade relacionada a tiopurina (SALAVAGGIONE *et al.*, 2002); e mais recentemente um SNP no gene *cyp1a2* que altera significativamente a farmacocinética de duas drogas (GTS-21 e AC-3933) e pode estar associado a grandes diferenças inter-individuais na cinética de uma terceira (YM-64227), (TENMIZU *et al.* 2004). Há uma preocupação com o uso de raças geneticamente puras em estudos de toxicidade e segurança de novas drogas para reduzir as potenciais diferenças inter-individuais (BLAISDELL *et al.*, 1998; COURT *et al.*, 1999; MISE *et al.*, 2004; FLEISCHER *et al.*, 2008; KAMIMURA, 2006).

Apesar dos cães serem uma espécie extensivamente utilizada pela indústria farmacêutica, sabe-se relativamente pouco sobre a sua capacidade metabólica e especificidade de substrato de cada isoforma P450 canina individualmente (ROUSSEL *et al.*, 1998). As enzimas da superfamília P450 são importantes na metabolização de diversas drogas utilizadas comercialmente assim como outras substâncias estranhas ao organismo (KIVISTO *et al.*, 1995). Várias P450 humanas mostraram apresentar expressão diferenciada, contudo a mais polimórfica já descrita é a *CYP2D6* (MEYER *et al.*, 1986). A presença de polimorfismo é primariamente caracterizada por dois fenótipos: indivíduos com a atividade normal da *CYP2D6* (metabolizadores normais - EMs) e indivíduos com diminuição dessa atividade (metabolizadores lentos - PMs) (DAHL *et al.*, 1995; FROMM *et al.*, 1997; ROUSSEL *et al.*, 1998). Em cães, seu ortólogo é chamado *cyp2d15*. O cDNA do gene *cyp2d15* foi seqüenciado por Sakamoto *et al.* (1995) sendo denominado mais tarde de *cyp2d15* WT1. Uma variante chamada de *cyp2d15* WT2 foi isolada por Roussel *et al.* (1998) em cães da raça Beagle mostrando três alterações na cadeia de aminoácidos (Ser186 > Gly, Ile250 > Phe e Ile307 > Val) em relação a *cyp2d15* WT1. Roussel *et al.* (1999) encontraram outra variante a *cyp2d15* V1, que difere da *cyp2d15* WT2 em três bases que resultam em uma mutação sinônima e duas não sinônimas, Ile338 > Val e Lys407 > Glu, além disso eles também



demonstraram a existência de duas novas variantes chamadas de *cyp2d15* \*2 e *cyp2d15* \*3, que diferem da *cyp2d15* WT1 por uma alteração (Ser186 > Gly) e duas substituições de aminoácidos (Ile250 > Phe e Ile307 > Val), respectivamente. Duas variantes com ausência de 51 aminoácidos resultantes de uma deleção *in-frame* do exon 3 nas *cyp2d15* WT2 e *cyp2d15* \*2, foram reportadas por Roussel *et al.* (1998) e Paulson *et al.* (1999) chamadas respectivamente de *cyp2d15* V2 e *cyp2d15* d. Contudo estas formas com deleções não afetaram a farmacocinética de nenhum químico por estarem expressas com sua forma ativa correspondente em todos os animais testados (ROUSSEL *et al.*, 1998).

O melhor conhecimento sobre a variação neste gene é importante para uma melhor compreensão da farmacocinética de diversos medicamentos em animais que poderão ser úteis também para estudos humanos. Este estudo apresenta novos SNPs em regiões codificantes, não codificantes e parte da seqüência, até agora obscura, do íntron localizado entre os exons 9 e 10 do gene *cyp2d15*. Quatro SNPs responsáveis pela alteração na cadeia de aminoácidos foram identificados. Estudos funcionais, dos SNPs encontrados neste trabalho são necessários para analisar o impacto destas alterações na atividade da enzima codificada pelo gene *cyp2d15*. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico de 30 cães (TABELA 01) foi extraído a partir de amostras de sangue periférico através do método de “*salting out*” a fim de identificar possíveis variantes na sequência do gene *cyp2d15* nas diversas raças. Para isso foram testados vários pares de oligonucleotídeos iniciadores desenhados com o *software* *OligoAnalyzer 3*, com base no genoma canino de uma fêmea da raça Boxer, disponível no *GenBank* do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As melhores seqüências de oligonucleotídeos e temperaturas de hibridização foram definidas através de um gradiente de temperatura (TABELA 02) utilizando-se o termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf). Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados com o corante fluorescente para ácidos nucleicos GelRed (*Biotium*). Posteriormente os produtos de PCR foram quantificados pelo programa *TotalLab TL100*. As regiões codificantes e flanqueadoras foram seqüenciadas em ambas as direções no seqüenciador automático *ABI Prism 3130 Avant Automatic Sequencer* (*Applied Biosystems*) após o tratamento com *shrimp alkaline phosphatase* (*GE Healthcare, USA*) e *exonuclease I* (*GE Healthcare, USA*) usando os iniciadores da PCR com *ABI BigDye Terminator Sequencing Kit 3.1* (*Applied Biosystems*). As seqüências foram posteriormente analisadas com o *software* *SeqScape v2.5* (*Applied Biosystems*) e alinhadas com o *software* *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

TABELA 01- EXONS DO GENE *cyp2d15* SEQÜENCIADOS ( 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 E 11) E NÚMERO DE ANIMAIS DE CADA RAÇA.

Raça	Exon	Número de animais
Akita	1, 8	1
Basset Hound	8	1
Beagle	8	1
Boxer	1,2,6,7,8	1
Bulldog	8	1
Cane Corso	8	1
Chow Chow	8	1
Cocker Spaniel	1,2,6,7,8,9	6

Collie	8,9	1
Dachshund	1,2,6,7,8,9,10,11	2
Dogue Alemão	8	1
Fila Brasileiro	8,9	1
Golden Retriever	8	1
Husky Siberiano	8,9	1
Maltês	8	1
Pastor Alemão	1,2,6,7,8,9	2
Poodle	1,2,6,7,8,9,10	2
Rottweiler	1,2,6,7,8,9	2
São Bernardo	8	1
Schnauzer	8,9	1
Weimaraner	8	1
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>30</b>

TABELA 02- SEQUÊNCIAS DE BASES DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, RESPECTIVOS EXONS, TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO E TAMANHO DO FRAGMENTO.

Oligonucleotídeos iniciadores	Exon	Temperatura de hibridização, (TA).	Tamanho do Fragmento
F 5'CTCCCTTTAGAAAGTGAGGC3'	1	58°C	638pb
R 5'CGGTTTCCTGACTGAGATG3'	1	58°C	
F 5'AGGGGAAGGAATTCTGGACT3'	2	60°C	735pb
R 5'TGGGTCCTCATTCCCGC3'	2	60°C	
F 5'CAGGAAAGAGGATCGAGGCG3'	6	60°C	333pb
R 5'ATTGTCCCGGACTCCTCACT3'	6	60°C	
F 5'TCTCTCCCTCTGCCCCAGAG3'	7	60°C	241pb
R 5'CCCAGGCTGTCCATCCTCTC3'	7	60°C	
F 5'TCAGACGTCCGAGTCCAGAC3'	8	58°C	293pb
R 5'CAGCATCAGGCTGTGACCAC3'	8	58°C	
F 5'CGCTGGGGAAGACAGGCTGA3'	9	60°C	136pb
R 5'AAGCTCCTGGGCACCCTCTC3'	9	60°C	
F 5'GAGTCCCTTAGCCCTGCCAT3'	10/ 11	58°C	761pb
R 5'CTGGTTTATTGTACCTCGGC3'	10/ 11	58°C	

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *cyp2d15* é composto por 11 exons que variam entre 60 a 189 pares de bases e 10 introns que variam entre 1 a mais de 600 pares de bases. Dois introns, entre os exons 3/4 e exons 9/10, não apresentam suas seqüências disponíveis nos bancos de dados públicos (representadas pela letra N) (NCBI, 2010).

#### 3.1 EXONS

Não foram observados polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em nenhuma das seqüências das raças seqüenciadas nos exons 1, 8 e 9. O mesmo grau de conservação não foi observado nos outros exons analisados. Foram identificados dois SNPs não sinônimos (nsSNP) não descritos na literatura no exon 2 (Ile109>Val; Leu115>Phe) ambos em cães da raça Poodle. Existem várias medidas na literatura que buscam quantificar a similaridade ou dissimilaridade entre dois aminoácidos (SNEATH, 1966; GRANTHAN, 1974; MIYATA *et al.*, 1979). Estas são chamadas de distâncias físico-químicas e se baseiam em propriedades como polaridade, volume molecular e composição química entre os aminoácidos (FIGURA 01). A distância físico-química entre a isoleucina (Ile) e a valina (Val) é 29 e entre a leucina (Leu) e a fenilalanina (Phe), 22 (GRANTHAN, 1974). Quanto maior a distância maior as diferenças entre os aminoácidos. Os aminoácidos mais diferentes físico-quimicamente entre si são a cisteína e o triptofano, enquanto que os mais similares são a leucina e a isoleucina, sendo as distâncias 215 e 5 respectivamente. As substituições de aminoácidos encontradas apresentam alterações físico-químicas pequenas entre os aminoácidos Ile/Val (29) e Leu/Phe (22), ou seja, por aminoácidos similares. A substituição de um aminoácido por outro similar é chamada de conservativa enquanto a substituição por um diferente se chama radical. A substituição do tipo conservativa é mais freqüente que a radical na evolução das proteínas (ZUCKERKANDL & PAULING, 1965). A FIGURA 02 apresenta uma representação gráfica da troca de aminoácidos pelo método de

Argyle (1980). Entre 60 a 90% das substituições de aminoácidos envolvem o aminoácido mais próximo do anel ou o segundo mais próximo (PIEBER & TOHA, 1983). Essa tendência foi observada em ambas substituições.

Arg	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Tyr	Cys	His	Gln	Asn	Lys	Asp	Glu	Met	Trp
110	145	74	58	99	124	56	142	155	144	112	89	68	46	121	65	80	135	177
	102	103	71	112	96	125	97	77	180	29	43	86	26	96	54	91	101	Arg
		98	92	96	32	138	5	22	36	198	99	113	153	107	172	138	15	61
			38	27	68	42	95	114	110	169	77	76	91	103	108	93	87	147
				58	69	59	89	103	92	149	47	42	65	78	85	63	81	128
					64	60	94	113	112	195	86	91	111	106	126	107	84	148
						109	29	50	55	192	84	96	133	97	152	121	21	88
							135	153	147	159	98	87	80	127	94	98	127	184
								21	33	198	94	109	149	102	168	134	10	61
									22	205	100	116	158	102	177	140	28	40
										194	83	99	143	85	160	122	36	37
											174	154	139	202	154	170	196	215
												24	68	32	81	40	87	115
													46	53	61	29	101	130
														94	23	42	142	174
															101	56	95	110
																45	160	181
																	126	152
																		67
																		Met

FIGURA 01 - DISTÂNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS ENTRE PARES DE AMINOÁCIDOS (GRANTHAN, 1974).

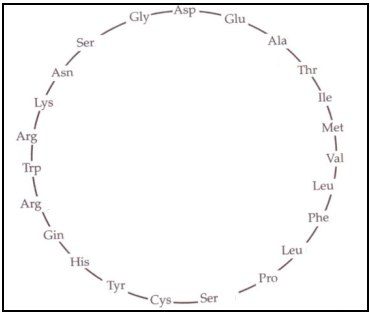


FIGURA 02 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA CIRCULAR DA TROCA DE AMINOÁCIDOS DE ACORDO COM O MÉTODO DE ARGYLE (1980) (PIEBER & TOHA, 1983).

O exon 6 apresentou a variação sinônima (Ala246>Ala) nos espécimes da raça Poodle, Dachshund e Cocker Spaniel (Tabela 3). Outro SNP não sinônimo (Phe250>Ile) já descrito por Roussel *et al.* (1998) em espécimes da raça Beagle, foi encontrado no exon 6 nos espécimes da raça Poodle e Dachshund. A distância físico-química entre esses dois aminoácidos é pequena, vinte e um (21), contudo não acompanha a tendência do anel, pois há três aminoácidos entre eles (FIGURA 02).

O exon 7 apresentou a variação não sinônima (Val338>Ile) na raça Poodle, já descrito anteriormente em Beagles por Roussel *et al.* (1998) e mais tarde por Paulson *et al.* (1999) (TABELA 03). A distância físico-química entre eles é 29 e seguiu a tendência

esperada, pois há apenas um aminoácido entre eles no anel (PIEBER & TOHA, 1983). A seqüência de resíduos com as substituições sinônimas e não sinônimas identificadas neste trabalho estão representadas na FIGURA 03.

Os exons 10 e 11 apresentaram seqüências bastante diferentes das dos bancos de dados, que por sua vez não correspondem as seqüências de aminoácidos descritas por Sakamoto *et al.* (1995 número do acesso BAA04220). As seqüências dos exons 10 e 11 encontradas, representadas nas FIGURAS 04 e 05, discordam da seqüência do NCBI em 17 e 24 pares de bases nos exons 10 e 11, respectivamente. As seqüências encontradas nos espécimes da raça Dachshund e Poodle para o exon 10 do gene *cyp2d15* correspondem 100% à cadeia de aminoácidos reportada por Sakamoto *et al.* (1995, número do acesso BAA04220), conforme a TABELA 04. As seqüências encontradas para o exon 11 do gene *cyp2d15* no espécime da raça Dachshund (TABELA 05) apresentam correspondência de 100% com a seqüência de aminoácidos descrita por Sakamoto *et al.* (1995, número do acesso BAA04220).

TABELA 03 - EXONS, NÚMERO DE BASES SEQÜENCIADAS SOBRE O NÚMERO TOTAL DE BASES DE CADA EXON, SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS (SN) E NÃO-SINÔNIMAS (NS) SEGUIDAS DA ALTERAÇÃO NO AMINOÁCIDO E RAÇAS QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.

<b>Exon</b>	<b>Número Bases</b>	<b>snSNP</b>	<b>nsSNP</b>	<b>a.a.</b>	<b>Mutações /pb</b>	<b>Raça (s)</b>
1	189/189	0	0	0	0	nenhuma
2	174/174	0	1542A-G <sup>1</sup> 1562G-C <sup>2</sup>	Ile109>Val Leu115>Phe	1/87	Poodle <sup>1,2</sup>
6	177/177	2832G-A <sup>3</sup>	2842T-A <sup>4</sup>	Ala246>Ala Phe250>Ile	1/88,5	Poodle <sup>3,4</sup> , Dachshund <sup>3,4</sup> , Cocker Spaniel <sup>3</sup> Poodle <sup>5</sup>
7	141/141	0	3165G-A <sup>5</sup>	Val338>Ile	1/141	
8	186/186	0	0	0	0	nenhuma
9	81/81	0	0	0	0	nenhuma

Legenda: Números sobrescritos representam as mutações presentes na raça.

Números que antecedem as bases representam a localização em relação à seqüência de referência no NCBI número do acesso NC\_006592 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A localização de início e término dos exons são respectivamente: exon 1: 580 e 760, exon 2: 1407 e 1578, exon 6: 2770 e 2938, exon 7: 3099 e 3232, exon 8: 3441 e 3621, exon 9: 3811 e 3889.

```

MGLLTGDTLGPLAVAVAIFLLLVDMHRRRRWATRYPPGPTPVMVGNLLQMDFQEPICYFSQLQGRFG
NVFSLELAWTPVVVLNGLEAVREALVHRSEDADRPPMPVYDHLGFGPESQGLFLARYGRAWREQRRF
SLSTLRNFGGLGRKSLEQWVTEEASCLCAAFAEQAGRPFGPGALLNKAVSNVISSLTYGRRFEYDDPRLQ
LLELTQQALKQDSGFLREALNSIPVLLHIPGLASKVFSAAKAIITLTNEMIQEHRKTRDPTQPPRHLIDAFVD
EIEKAKGNPKTSFNEENLCMVTSDLFIAGMVSTSITLTWALLMILHPDVQRRVQQEIDEVIGREQLPEMGD
QTRMPFTVAVIHEVQRFQDIVPLGVPHMTSRDTEVQGFLIPKGTTLITNLSSVLKDEKVVKKPFRFYPEHF
LDAQGHFVKHEAFMPFSAGRRVCLGEPLARMELFFFTCLLQRFSSVPAGQPRPSDHGVFTFLKVPAPF
QLCVEPR

```

FIGURA 03 - SEQÜÊNCIA DE RESÍDUOS: <sup>SN</sup>SNP, <sup>NS</sup>SNP E ALTERNÂNCIA DE EXONS.

Exons alternam as cores do texto e a cor vermelha indica a falta de correspondência exon/a.a entre os códons presentes na sequência do NCBI e os aminoácidos descritos por SAKAMOTO *et al*, 1995 (número de acesso BAA04220).

Letras preenchidas na cor vermelha ressaltam as substituições não sinônimas ( nsSNP).

Letras preenchidas na cor azul ressaltam as substituições sinônimas( snSNP).

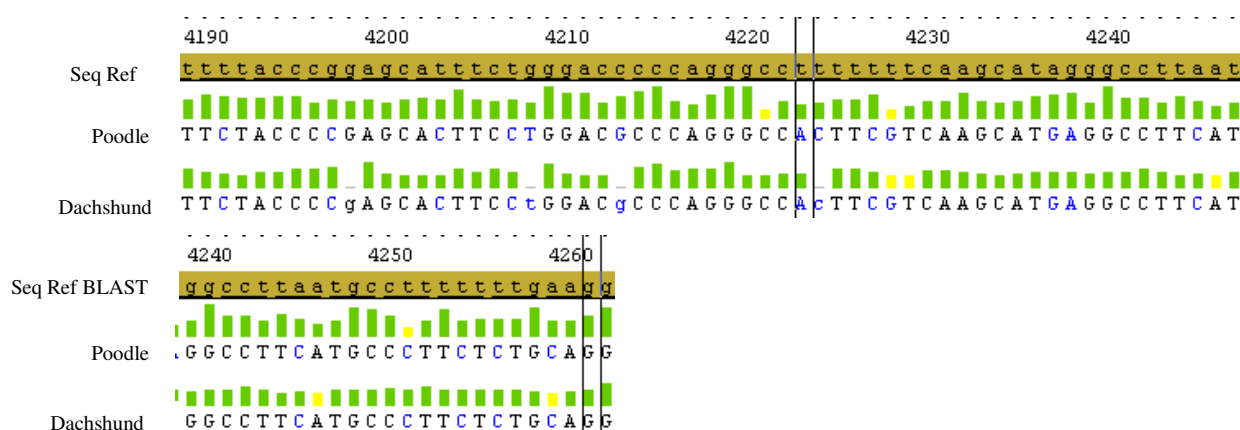


FIGURA 04 - ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQÜÊNCIA DO EXON 10 (74PB) DO GENE *cyp2d15* DO BANCO DE DADOS PÚBLICO NCBI (*SeqRef*) COM AS SEQÜÊNCIAS OBTIDAS PELO PROGRAMA *SeqScape* (APPLIED BIOSYSTEMS).

Ilustração obtida pelo programa *SeqScape* V2.5: sequência preenchida pela cor laranja na primeira linha foi obtida no NCBI, segunda linha apresenta a sequência obtida de um espécime da raça Poodle e a terceira linha apresenta a sequência de um espécime da raça Dachshund. Os retângulos sobre as letras representados em diferentes tamanhos e com as cores verde e amarelo devem ser interpretados como quanto maior o retângulo melhor a qualidade do pico obtido sendo a cor verde melhor do que a cor amarela. As letras representadas pela cor azul indicam as bases que diferem da sequência referência.

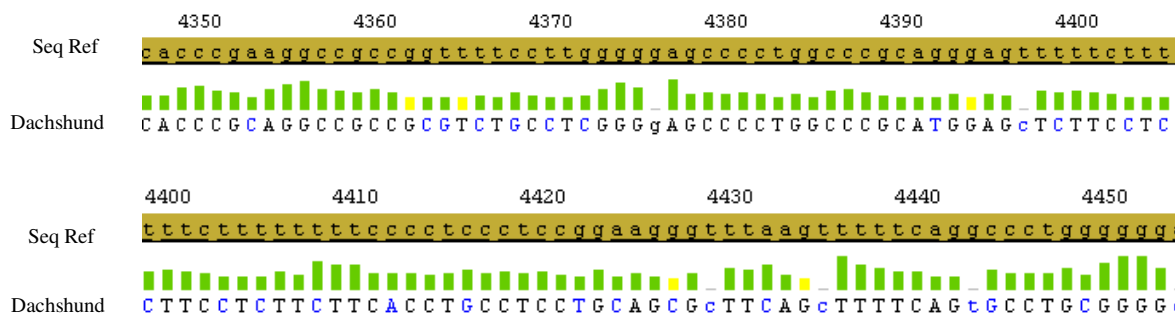


FIGURA 05 - ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQUÊNCIA DO EXON 11 (98 PB) DO GENE *cyp2d15* DO BANCO DE DADOS PÚBLICO NCBI COM AS SEQUÊNCIAS DEMONSTRADAS PELO PROGRAMA *SEQSCAPE* V2.5 (APPLIED BIOSYSTEMS).

Sequências obtidas pelo programa *SeqScape* V2.5: sequência preenchida pela cor laranja, na primeira linha, foi obtida no NCBI, segunda linha apresenta a sequência obtida de um espécime da raça Dachshund. Os retângulos sobre as letras representados em diferentes tamanhos e com as cores verde e amarelo devem ser interpretados como quanto maior o retângulo melhor a qualidade do pico obtido, sendo a cor verde melhor do que a cor amarela. As letras representadas pela cor azul indicam as bases que diferem da sequência referência.

TABELA 04 - COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS OBTIDA A PARTIR DA SEQUÊNCIA DE PARES DE BASES DO EXON 10 DO GENE *cyp2d15* DOS ESPÉCIMES DA RAÇA DACHSHUND E POODLE COM AS SEQUÊNCIAS DE PARES DE BASES REFERÊNCIA DISPONIBILIZADA PELO BANCO DE DADOS PÚBLICO (NCBI) E COM A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS REPORTADA POR SAKAMOTO *ET AL* (1995).

Exon 10	GAC	GAG	AAG	GTC	TGG	AAG	AAG	CCC	TTC	CGC	TTC	TAC	CCC	GAG	CAC
Ref NCBI	D	E	K	V	W	K	K	P	F	R	F	Y	P	E	H
Sakamoto -1995	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCT	TTC	CGT	TTT	TAC	CCG	GAG	CAT
									F	R	F	Y	P	E	H
	D	E	K	V	W	K	K	P	F	R	F	Y	P	E	H

Exon 10	TTC	CTG	GAC	GCC	CAG	GGC	CAC	TTC	GTC	AAG	CAT	GAG	GCC	TTC	ATG	CCC	TTC	TCC
Ref NCBI	F	L	D	A	Q	G	H	F	V	K	H	E	A	F	M	P	F	S
Sakamoto -1995	TTC	TGG	GAC	CCC	CAG	GGC	CTT	TTT	TTC	AAG	CAT	AGG	GCC	TTA	ATG	CCT	TTT	TTT
	F	W	D	P	Q	G	L	F	F	K	H	E	A	L	M	P	F	F
	F	L	D	A	Q	G	H	F	V	K	H	E	A	F	M	P	F	S

Letras em preto representam os códons do exon 10, sendo que a primeira linha contem as bases do espécime da raça Poodle e a terceira linha a sequência referencia do NCBI. Os aminoácidos estão representados pelas cores azul e vermelha, sendo que a cor azul indica correspondência e a vermelha indica discrepância entre a sequência referência e os aminoácidos descritos por Sakamoto *et al.*, 1995 (número de acesso BAA04220).



TABELA 05 - COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS OBTIDA A PARTIR DA SEQÜÊNCIA DE PARES DE BASES DO EXON 11 DO GENE *cyp2d15* DOS ESPÉCIMES DA RAÇA DACHSHUND COM AS SEQÜÊNCIAS DE PARES DE BASES REFERÊNCIA DISPONIBILIZADA PELO BANCO DE DADOS PÚBLICO (NCBI) E COM A SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS REPORTADA POR SAKAMOTO *ET AL* (1995).

Exon 11	GCA	GGC	CGC	CGC	GTC	TGC	CTC	GGG	GAG	CCC	CTG	GCC	CGC	ATG	GAG	CTC	TTC	CTC
RefNCBI E11	A	G	R	R	V	C	L	G	E	P	L	A	R	M	E	L	F	L
Sakamoto 1995	E	G	R	R	F	S	L	G	E	P	L	A	R	R	E	F	F	F
	A	G	R	R	V	C	L	G	E	P	L	A	R	M	E	L	F	L

Exon 11	TTC	TTC	ACC	TGC	CTC	CTG	CAG	CGC	TTC	AGC	TTT	TCA	GTG	CCT	GCG	GGG	CAG
RefNCBI E11	F	F	T	C	L	L	Q	R	F	S	F	S	V	P	A	G	Q
Sakamoto (1995)	F	F	P	S	L	R	K	G	L	S	F	S	G	P	G	G	K
	F	F	T	C	L	L	Q	R	F	S	F	S	V	P	A	G	Q

Exon 11	CCC	CGG	CCC	AGC	GAC	CAC	GGG	GTC	TTC	ACC	TTC	CTG	AAG	GTT	CCA	GCC
RefNCBI E11	P	R	P	S	D	H	G	V	F	T	F	L	K	V	P	A
Sakamoto (1995)	P	G	P	R	D	Q	G	V	F	P	F	R	K	V	P	A
	P	R	P	S	D	H	G	V	F	T	F	L	K	V	P	A

Exon 11	CCC	TTC	CAG	CTC	TGT	GTG	GAG	CCT	CGC
RefNCBI E11	P	F	Q	L	C	V	E	P	R
Sakamoto (1995)	P	F	Q	F	W	G	D	P	P
	P	F	Q	L	C	V	E	P	R

Letras em preto representam os códons do exon 11, sendo que a primeira linha contem as bases do espécime da raça Poodle e a terceira linha a sequência referência do NCBI. Os aminoácidos estão representados nas cores azul e vermelha sendo que a cor azul indica correspondência e a vermelha indica discrepância entre a sequência referência e os aminoácidos descritos por Sakamoto *et al.*, 1995 (número de acesso BAA04220).

A maioria das alterações identificadas neste trabalho foi encontrada na raça Poodle, que já foi seqüenciada: um macho chamado Shadow, com uma cobertura de 1,5x (KIRKNESS *et al.*, 2003). Já estão disponíveis nos bancos de dados públicos, 2,5

milhões de SNPs que foram obtidos através da comparação da raça Poodle com a raça Boxer e nove outras raças (LINDBLAD-TOH, 2004). Nenhum polimorfismo encontrado nos espécimes da raça Poodle neste trabalho havia sido descritos no cão Shadow. OSTRANDER & WAYNE (2005) em seu trabalho com 96 microssatélites, em 414 animais de 85 raças distintas encontraram maior similaridade de seqüências de microssatélites na mesma raça que entre raças e especulou que o mesmo ocorreria em relação aos genes. Além disso, seu trabalho lhes permitiu dividir os cães em quatro grupos que presumidamente compartilhavam um ancestral comum. Eles dividiram as 85 raças em quatro grandes grupos: asiático, caça, pastoreio e Mastiff. O Poodle foi categorizado no grupo de cães de caça. Ficou demonstrado neste trabalho que ele compartilha o SNP (2832G-A) com Dachshund e Cocker, estas raças também pertencentes ao grande grupo dos cães de caça e presumivelmente um ancestral comum.

As taxas de mutação em sítios sinônimos e não sinônimos em um gene deveriam ser iguais, ou pelo menos similares. Por isso a diferença que existe entre o número de substituições sinônimas e não sinônimas deve ser atribuído a diferenças na intensidade de seleção purificadora entre os dois tipos de sítios. Mutações com alteração de aminoácidos apresentam maior probabilidade de causarem efeitos deletérios na função protéica do que as alterações sinônimas (GRAUR & LI, 1999).

### 3.2. INTRONS

As regiões flangeadoras estudadas apresentaram um total de 11 SNPs e uma inserção (TABELA 06). Um total de 107 pares de bases do intron 1 foram seqüenciados e os SNPs 450 C-T e 511 A-G foram identificados nas raças Pastor Alemão e Poodle respectivamente. Um total de 639 pares de bases do intron 2 foram seqüenciados e apresentaram o SNP 875 A-G nas raças Beagle, Cocker Spaniel, Collie, Daschund, Dogue Alemão, Fila Brasileiro, Husky Siberiano e os SNPs 875 A-G, 1023 G-A e 1027 T-C nas raças Poodle e Rottweiler. Nas 136 bases analisadas do intron três as seguintes alterações foram observadas: 2636 G-A na raça Rottweiler, 2676 C-G, 2682

C-G e uma inserção ACTG na posição 2721 na raça Poodle e 2690 C-G em Daschund. No intron 4, das 183 bases estudadas, duas apresentaram polimorfismos: 3645 C-T em Daschund e 3674 G-A em Collie, São Bernardo e Golden Retriever.

TABELA 06 - INTRONS, NÚMERO DE BASES SEQUENCIADAS SOBRE O NÚMERO TOTAL DE BASES DE CADA INTRON, SUBSTITUIÇÕES DAS BASES E RAÇAS QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.

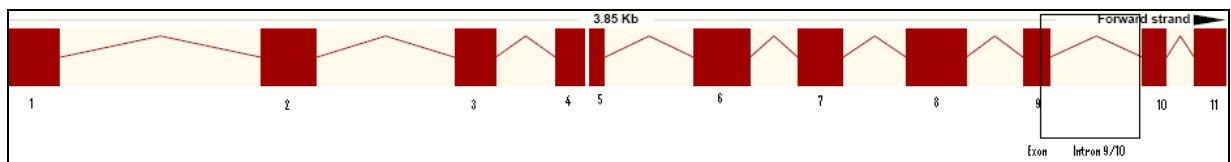
<b>Região</b>	<b>pb</b>	<b>SNP</b>	<b>InDel</b>	<b>SNPs/pb</b>	<b>Raça (s)</b>
1	107	450 C-T <sup>1</sup> 511 A-G <sup>2</sup>	0	1/53,5	Pastor Alemão <sup>1</sup> e Poodle <sup>2</sup>
2	639	875 A-G <sup>3</sup> 1023 G-A <sup>4</sup> 1027 T-C <sup>5</sup>	0	1/213	Beagle <sup>3</sup> , Cocker <sup>3</sup> , Collie <sup>3</sup> , Dachshund <sup>3</sup> , Dogue Alemão <sup>3</sup> , Fila <sup>3</sup> , Husky <sup>3</sup> , Poodle <sup>3,4,5</sup> e Rottweiler <sup>3,4,5</sup>
3	136	2636 G-A <sup>6</sup> 2676 C-G <sup>7</sup> 2682 C-G <sup>8</sup> 2690 C-G <sup>9</sup>	inACTG 2721 <sup>10</sup>	1/34	Dachshund <sup>9</sup> , Poodle <sup>7,8,10</sup> e Rottweiler <sup>6</sup>
4	183	3645 C-T <sup>11</sup> 3674 G-A <sup>12</sup>	0	1/91,5	Collie <sup>12</sup> , Dachshund <sup>11</sup> , Golden Retriever <sup>12</sup> e Sao Bernardo <sup>12</sup>

Legenda: Números sobrescritos representam as mutações presentes na raça.

Números que antecedem as bases representam a localização em relação à sequência de referência no NCBI número do acesso [NC\\_006592](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/NC_006592) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). As regiões estão representadas da seguinte forma: região 1 = 107pb *upstream* exon 1, Região 2 = 639pb intron 1 completo, Região 3 = 136pb *upstream* exon 6 e a Região 4 = 183 intron 8 completo.

Foram testados 10 oligonucleotídeos iniciadores em diferentes gradientes de temperatura na região subjacente ao intron desconhecido que está localizado entre os exons 9 e 10. O par de oligonucleotídeos F 5'CGCTGGGGAAGACAGGCTGA3' e R 5'CTGGTTTATTGTACCTCGGC 3' gerou um produto de 849pb. O oligonucleotídeo forward foi utilizado no seqüenciamento e gerou uma seqüência de 345pb, 114 pb do exon 9 e 241 bases do intron 9/10 em quatro cães de três raças, Daschund, Basset Hound e Husky Siberiano. Estas seqüências estão representadas pela N nos bancos de dados públicos. As 114 bases do exon 9 apresentaram 100% de similaridade com a seqüência depositada no GenBank (FIGURA 06). Ao realizar a verificação de similaridade da nova seqüência obtida do intron entre os exons 9 e 10 através do programa BLAST, ela apresentou 96% de identidade com uma seqüência do cromossomo 11 (27,981K-28,081K pb) (FIGURA 07). A comprovação da confiabilidade desta seqüência através da obtenção do fragmento reverso através do seqüenciamento

é muito importante. Esta sequência pode ter origem com elementos de transposição ou duplicações de segmentos gênicos seguida de transposição ou até mesmo pode haver ocorrido problemas de mal pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores nos quatro espécimes em questão. Esse mal pareamento é pouco provável pelo fato de 114 pb, parte das 374 bases do produto da PCR, estarem presentes apenas na região do exon 9 do gene *cyp2d15* segundo o programa BLAST. Existe ainda a possibilidade destas sequências estarem presentes em outros locais do genoma canino ainda não elucidadas. As sequências de oligonucleotídeos com respectivas temperaturas de hibridização estão descritas na TABELA 07. A FIGURA 08 mostra o alinhamento das sequências nos quatro cães demonstrando 100% de similaridade.



Região em destaque no quadrado representa parte do exon e intron cuja sequência foi obtida em quatro animais.

FIGURA 06 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS 11 EXONS E INTRONS DO GENE *cyp2d15*.

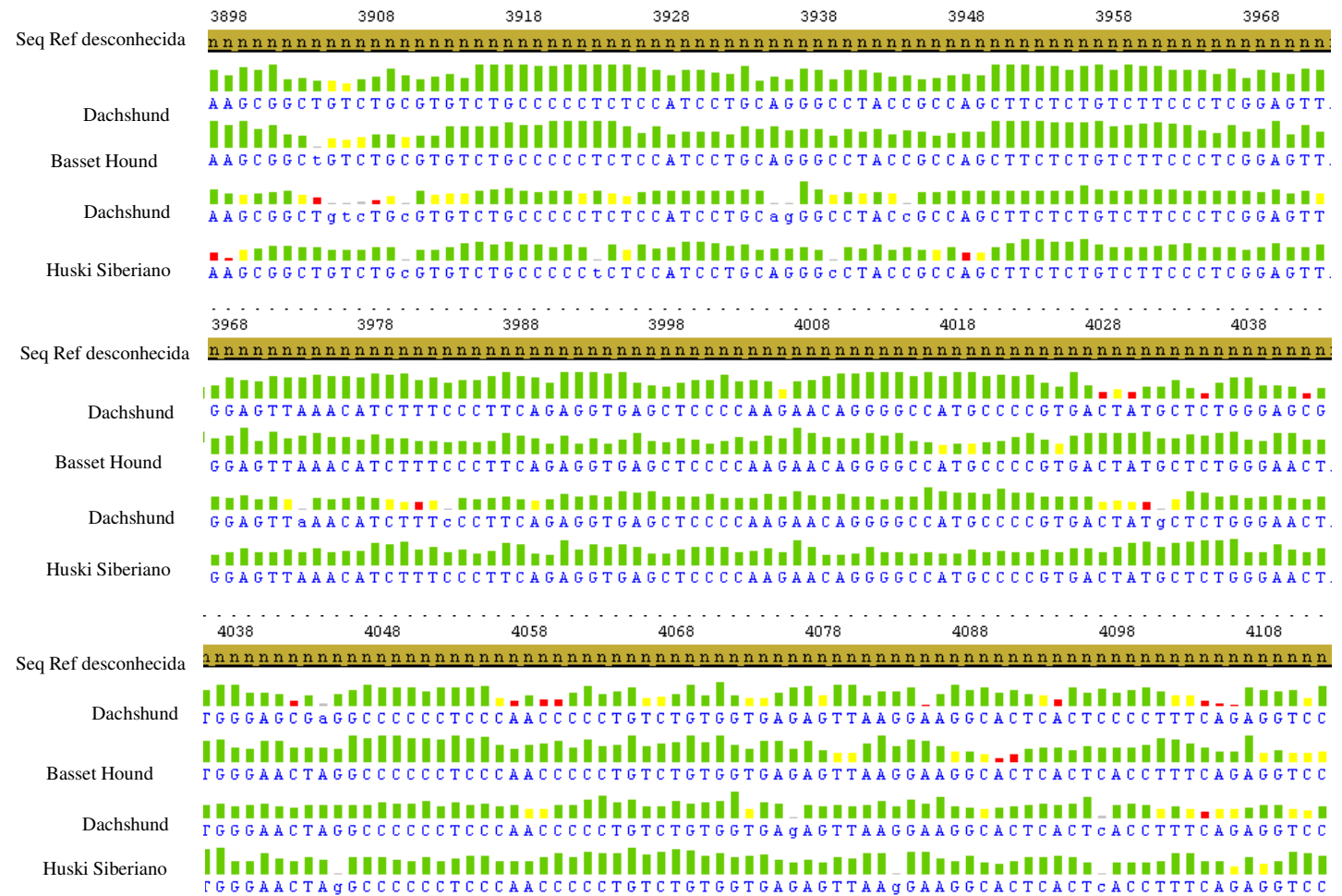


FIGURA 07 - SEQUÊNCIA ENTRE OS EXONS 9/10 DO GENE *cyp2d15* PELO PROGRAMA *SEQSCAPE* (APPLIED BIOSYSTEMS).

Sequências obtidas pelo programa *SeqScape* V2.5: sequência preenchida pela cor laranja, na primeira linha, foi obtida no NCBI, segunda e quarta linha apresenta a sequência obtida de um espécime da raça Dachshund, sendo que a terceira e última linha apresentam as sequências de um espécime da raça Basset Hound e Huski Siberiano respectivamente. Os retângulos sobre as letras representados em diferentes tamanhos e com as cores verde e amarelo devem ser interpretados como: quanto maior o retângulo melhor a qualidade do pico obtido, sendo a cor verde melhor do que a cor amarela. As letras representadas pela cor azul representam as bases que diferem da sequência referência.

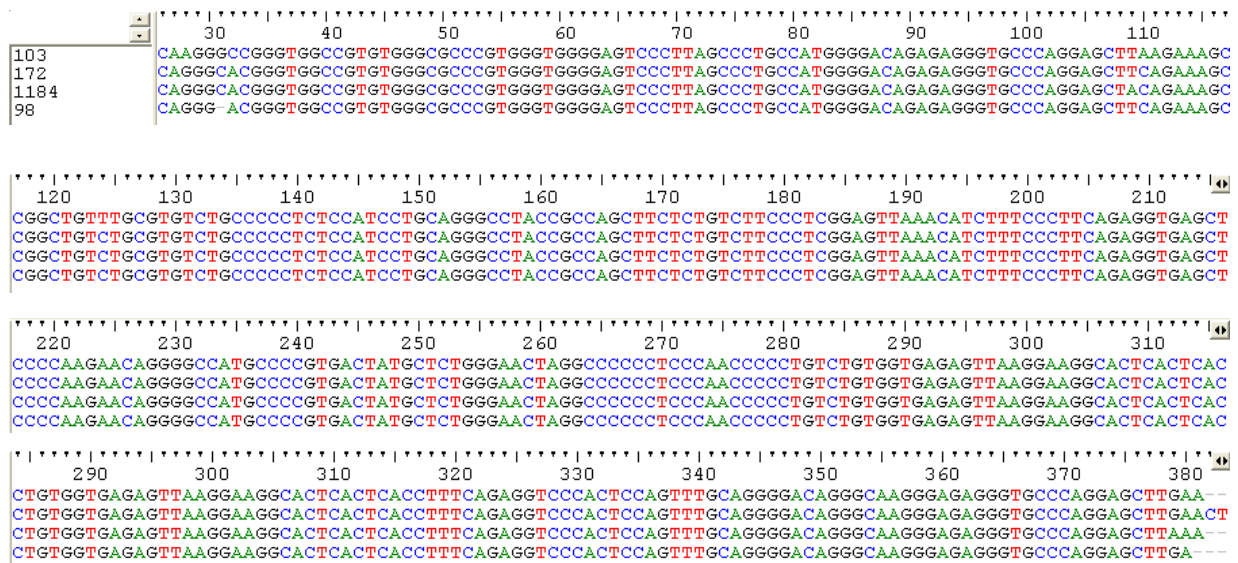


FIGURA 08 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO TERMINAL AO EXON 9 E INTRON DESCONHECIDO NOS QUATRO ANIMAIS DAS RAÇAS BASSET HOUND, DACHSHUND E HUSKY SIBERIANO.

Sequências obtidas pelo programa *BioEdi Sequence Alignment Editor*: bases iguais apresentam a mesma cor, posição 1 representa a primeira base do exon e posição 380 a última base do exon. Primeira linha representada pelo número 107 é de um espécime da raça Basset Hound, a segunda linha representada pelo número 172 um Husky Siberiano, a terceira linha representada pelo número 1184 e a última linha representada pelo número 98, ambos, da raça Dachshund.

### 3.3. ANÁLISE *IN SILICO* DOS SÍTIOS DE *SPLICING*

Para avaliar as possíveis consequências funcionais de polimorfismos em regiões vizinhas aos sítios de *splicing* dos exons 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, foi utilizado o programa NNSPLICE 0.9 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), baseado em redes neurais artificiais (*neural network*) para prever sítios de *splicing* em seqüências genômicas (REESE *et al.*, 1997. A TABELA 08 resume as junções intron/exon com respectivos escores identificados pelo programa para cada sítio de recomposição alternativa acceptor (*Splice acceptor site*) e doador (*Splice donor site*).

A região 5'UTR, exons 6, 7, 8 e 9 apresentaram sítios de *splicing* aceptores e doadores canônicos (AG/GT). Os sítios próximos ao exon 2 não foram reconhecidos pelo programa, contudo pela proximidade com as junções intron/exon esperar-se-ia que fossem (AG/GC) canônico e não canônico, respectivamente. Para o exon 10 o sítio acceptor foi identificado pelo programa com escore alto (0,97) canônico (AG), porém o

doador não foi reconhecido. Pela proximidade com a junção intron/exon esperar-se-ia que fosse o dinucleotídeo canônico GT. A região 3'UTR identificada pelo programa como sítio de *splicing* acceptor foi o dinucleotídeo canônico AG. Mais estudos são necessários para uma melhor identificação dos sítios de *splicing* destas seqüências.

Dois sítios não puderam ser identificados corretamente, pois apresentaram distância muito grande da junção, ou sobreposição de acceptor com doador. Não foram encontrados SNPs, inserções ou deleções nos sítios indicados pelo programa e tampouco nas seqüências vizinhas em 20pb amontante ou a jusante.

TABELA 07 - ESTRUTURA GENÔMICA DO *cyp2d15* MOSTRANDO AS JUNÇÕES INTRON/EXON E OS TAMANHOS DOS INTRONS E EXONS.

<b>Local Exon</b>	<b>Tam. Exon (pb)</b>	<b>Sítio acceptor</b>	<b>Sítio doador</b>	<b>Tam Intron (pb)</b>	<b>Escore Acceptor/Doador</b>
5'UTR / Ex1	189		<u>tcagccag</u> <b>GT</b> aaggaagg	638	1,00
2	174	tggcctgc <b>AG</b> ctgcaagg	<u>atcccaag</u> <b>GC</b> aagcgggg	436	NI
6	177	caccccg <b>AG</b> gccctgaa	<u>tagaaaa</u> <b>GT</b> gaggagtc	152	0,67/0,85
7	142	catggcct <b>AG</b> gccaaagg	<u>cgtgcagc</u> <b>GT</b> gagcccag	200	0,41/0,53
8	188	gtgtgtct <b>AG</b> gacgtgtc	<u>tccccaag</u> <b>GT</b> aggtctgc	181	0,60/1,00
9	83	gtccctc <b>AG</b> agctgcc	ttcagag <b>GT</b> gagctc *	282	0,97/0,82
10	102	tttttga <b>AG</b> gtgggggggt	cctttcc <b>GT</b> ttttaccc	88	0,97/NI
3'UTR	176	acccga <b>AG</b> gccgccggtt			0,71

NI: Não identificado pelo programa NNSPLICE 0.9

\*Identificado através do seqüenciamento das regiões "n" desconhecidas.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que existem polimorfismos entre as diversas raças caninas o que deve ser levado em consideração ao utilizar o cão como modelo animal em estudos farmacológicos. Mais estudos são necessários para avaliar estas alterações no nível funcional. A maior compreensão deste e de outros genes do biometabolismo canino poderão auxiliar não apenas no desenvolvimento e avaliação de medicamentos humanos, mas também beneficiarão a população de animais de estimação e trarão mercados para os fabricantes de novos medicamentos e terapias. Outros exons precisam ser seqüenciados e estudos funcionais precisam ser realizados para uma melhor caracterização do gene *cyp2d15* em cães. Futuramente, a tecnologia dos microarranjos poderá estar disponível para diferenciar polimorfismos caninos quanto às enzimas do metabolismo em um só teste, tecnologia já disponível para seres humanos sendo que o *AmpliChip CYP450* já está aprovado pelo FDA ([www.amplichip.us](http://www.amplichip.us)).



## REFERÊNCIAS

AKC: American Kennel Club. Disponível em: [http://www.akc.org/reg/dogreg\\_stats.cfm](http://www.akc.org/reg/dogreg_stats.cfm)  
Acesso em 2 de junho de 2010.

AmpliChip CYP450 Test package insert. Roche Diagnostics. Disponível em:  
<http://www.amplichip.us/>. Acesso em fevereiro de 2010.

BLAISDELL, J.; GOLDSTEIN, J. A.; BAI, A. Isolation of a new canine cytochrome P450 cDNA from the cytochrome P450 2C subfamily (CYP2C41) and evidence for polymorphic differences in its expression. **Drug Metabolism and Disposition**, 26:278–283, 1998.

COURT, M.H.; HAY-KRAUS, B.L.; HILL, D.W.; KIND, A.J.; GREENBLATT, D.J. Propofol hydroxylation by dog liver microsomes: assay development and dog breed differences. **Drug Metabolism and Disposition**, 27(11):1293-9, 1999.

DAHL, M.L.; YUE, Q.Y.; ROH, H.K.; JOHANSON, I.; SAWE, J.; SJOQVIST, F.; BERTILSSON, L. Genetic analysis of the CYP2D6 locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. **Pharmacogenetics**, 5:159–164. 1995.

FLEISCHER, S.; SHARKEY, M.; MEALEY, K.; OSTRANDER, E. A., AND MARTINEZ, M. Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. **The AAPS Journal**, 10(1) 110-119, 2008.

FROMM, M. F.; KROEMER, H. K.; EICHELBAUM, M. Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. **Advanced Drug Delivery**, 27: 171–199, 1997.

GRANTHAN, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. **Science**, 185: 862-864, 1974.

HOUGHTON . The American Heritage Dictionary of the English Language, 4th ed., Mifflin Company, Boston, MA, 2000.

IRION, D.N.; SCHAFFER, A.L.; FAMULA, T.R.; EGGLESTON, M.L.; HUGHES, S.S.; PEDERSEN, N.C. Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. **Journal of Heredity**, 94(1):81-87, 2003.

KAMIMURA, H.. Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. **Archives of Toxicology**, 80: 732–738, 2006.

KIRKNESS, E.F. *et al.* The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, 301(5641):1898-1903, 2003.

KIVISTO, K. T.; HEYO, K. K.; EICHELBAUM, M. The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 40: 523-530, 1995.

LINDBLAD, K.; WADE, M. C.; MIKKELSEN, S. T.; KARLSSON, K. E.; JAFFE, B. D. KAMAL, M. CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULBOKAS, E. J. ; ZODY, M. C.; MAUCELI E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A.; PONTING, C. P.; GALIBERT, F.; SMITH, D. R.; DEJONG, P. J.; KIRKNESS, E. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, 438: 803-819, 2005.

MEALEY, K.L.; BENTJEN, S.A.; GAY, J.M.; CANTOR, G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, 11(8):727-33, 2001.

MEYER, U. A.; GUT, J.; KRONBACH, T.; SKODA, C.; MEIER, U. T., CATIN, T. The molecular mechanisms of two common polymorphisms of drug oxidation--evidence for functional changes in cytochrome P450 isozymes catalysing bufuralol and mephentanyl oxidation. **Xenobiotica**, 16:449–464, 1986.

MISE, M.; YADERA, S.; MATSUDA , M.*et al.* Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, 32:240–245, 2004.

MIYATA, T.; MIYAZAWA, S.; YASUNAGA, T. Two types of amino acids substitutions in protein evolution. **Journal of Molecular Evolution**, 12:219-236, 1979.

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information*. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em 18 de fevereiro de 2007.

OSTRANDER, E. A.; WAYNE, R. K. The canine genome. **Genome Research**, 15:1707-1716, 2005.

PARKER, H.G.; OSTRANDER, E.A. Canine genomics and genetics: running with the pack. **PLoS Genetics**, 1(5):507-511, 2005.

PAULSON, S. K.; ENGEL, L.; REITZ, B.; *et al.* Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase inhibitor, celecoxib. **Drug Metabolism and Disposition**, 27:1133–1142, 1999.

PIEBER, M.; TOHA, J. Code dependent conservation of the physico-chemical properties in amino acid substitutions, **Original Life**, 13:139-146, 1983.

ROUSSEL, F.; DUIGNAN, D. B.; LAWTON, M. P.; OBACH, R.; STRICK, C. A.; TWEEDIE, D. J. Expression and Characterization of Canine Cytochrome P450 2D15\*1. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 357(1):27-36, 1998.

SAKAMOTO, K.; KIRITA, S.; BABA, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAZOE, Y.; KATO, R.; TAKANAKA, A.; MATSUNABA, T. A new cytochrome P450 form belonging to the CYP2D in dog liver microsomes: purification, cDNA cloning and enzyme characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 319:372–382, 1995.

SALAVAGGIONE, O.E.; KIDD, L.; PRONDZINSKI, J.L.; SZUMLANSKI, C.L.; SHANE PANKRATZ, V.; WANG, L.; TREPANIER, L.; WEINSHILBOUM, R.M. Canine red blood cell thiopurine S-methyltransferase: companion animal pharmacogenetics. **Pharmacogenetics** 12:713-724, 2002.

SNEATH, P. H. A. Relations between chemical structure and biological activity in peptides. **Journal of Theoretical Biology**, 12: 157-195, 1966.

SUTTER, N.B., EBERLE, M.A., PARKER, H.G., PULLAR, B.J., KIRKNESS, E.F., KRUGLYAK, L., OSTRANDER, E.A. Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. **Genome Research**, 14: 2388–2396, 2004.

TENMIZU, D.; ENDO, Y.; NOGUCHI, K.; KAMIMURA, I. Identification of the novel canine CYP1A2 1117 C > T SNP causing protein deletion. **Xenobiótica**, 34(9):835-46, 2004.

UNIPROT: *Universal Protein Resource*. Disponível em: <http://www.uniprot.org>. Acesso em 12 de março de 2009.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, 97-166, 1965.

## **CAPÍTULO II**

### **POLIMORFISMOS DO GENE *cyp2d15* EM ESPÉCIES DE CANÍDEOS SELVAGENS CATIVOS SUL-AMERICANOS**

## RESUMO

O gene *cyp2d15* canino é ortólogo ao *CYP2D6* humano, o mais polimórfico dos genes *CYP* nesta espécie. A subfamília P450 2D (*CYP2D*) apresenta um papel importante no metabolismo de mais de 30 drogas utilizadas comercialmente. Pouco se sabe sobre este gene em canídeos selvagens. O DNA de 8 canídeos selvagens cativos sul-americanos pertencentes a 4 gêneros distintos: cachorro-do-mato, graxaim-do-campo, cachorro-vinagre e lobo-guará (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*) foi extraído das amostras de sangue periférico através do método de fenol-clorofórmio. Os exons 1, 6, 7, 8 e 9 foram investigados para polimorfismos de base única (SNPs) usando o seqüenciador de DNA *ABI Prism 3130 Avant Automatic Sequencer* com o kit de terminadores de cadeia *ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e analisados com o programa *SeqScape v2.5*. O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi baseado na seqüência do genoma de uma fêmea canina da raça Boxer usando o programa *OligoAnalyzer 3*. A caracterização do gene *cyp2d15* nos quatro gêneros de canídeos, revelou oito (8) SNPs distribuídos em quatro dos cinco exons selecionados. Um total de 771 pb de seqüências codificadoras foram seqüenciadas, demonstrando uma freqüência média de um SNP para cada 96 bp (1/96). Um total de 882 pb das regiões flangeadoras foi seqüenciado apresentando 10 SNPs, um a cada 88pb e também duas inserções. Na comparação das quatro espécies de canídeos selvagens com *Canis familiaris*, as seqüências apresentaram similaridades que variaram entre 97 a 100%, esta grande similaridade encontrada explica o funcionamento dos oligonucleotídeos desenhados com o genoma de *Canis familiaris*. Implicações clínicas do SNP identificado nestes animais precisam ser estudadas uma vez que a alteração na seqüência de aminoácidos pode alterar o metabolismo de detoxificação de compostos por essas vias metabólicas e há um possível risco de reações adversas ao tratar tanto canídeos cativos quanto de vida livre. Estudos funcionais precisam ser realizados e outros exons do gene *cyp2d15* precisam ser seqüenciados para uma melhor caracterização deste gene em canídeos selvagens.

**PALAVRAS-CHAVE:** *cyp2d15*, seqüenciamento, canídeos selvagens, polimorfismos genéticos

## ABSTRACT

*cyp2d15* is ortholog of human *CYP2D6*, the most notable polymorphic *CYP* in humans. The P450 2D (*CYP2D*) subfamily plays an important role in the metabolism of over 30 clinically used drugs. Little is known about this gene in wild canids. DNA from 8 South America wild canids from 4 different genuses: crab-eating dogs, pampas fox, bush dogs and maned wolves (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*) was extracted from blood samples by the phenol chloroform method. The exons 1, 6, 7, 8 and 9 were screened for single nucleotide polymorphisms (SNPs) using DNA sequencing in an ABI Prism 3130 Avant Automatic Sequencer with ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and analyzed with the software SeqScape v2.5. The gene primer sequence design was based on the female boxer genome sequence using OligoAnalyzer 3.0 software. The gene *cyp2d15* characterization in the four genuses of canids revealed eight (8) SNPs distributed in four of the five selected exons. A total of 771bp coding sequences was sequenced yielding an average frequency of one SNP per 96bp (1/96). A total of 882 pbs of flanking regions was sequenced yielding 10 SNPs, one SNP per 88bp and also 2 insertions. The comparison of the four genuses of wild canids with *Canis familiaris* showed 97 to 100% similarity between the sequences, explaining the functioning of the primers designed with the canine genome. Possible clinical implications of SNPs identified in this animals need to be searched since the alteration in amino acid sequence may alter the metabolism of compounds detoxified by these pathways, and there is a possible risk of adverse reactions when treating both captive and free-ranging animals. Functional studies should be performed and other exons of *cyp2d15* need to be sequenced for a better characterization of this gene in wild and domestic canids.

KEY-WORDS: *cyp2d15*, sequencing, wild canids, genetic polymorphisms

## 1.INTRODUÇÃO

Apesar de sua origem Norte-Americana e invasão recente, a maior diversidade canídea existente é encontrada no continente Sul-Americano, com seis gêneros e onze espécies reconhecidas (WOZENCRAFT, 2005). Estão incluídas entre essas espécies de canídeos sul-americanos chamados de fauna nativa: o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (WOZENCRAFT, 2005). Pouco se conhece sobre a variabilidade genética das espécies canídeas da fauna nativa da America do Sul. Estudos prévios concentraram seus esforços no seqüenciamento do genoma do cão doméstico (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; KIRKNESS *et al.*, 2003) e em algumas seqüências aleatórias de canídeos norte-americanos como o lobo cinzento (*Canis lupus*) e o coiote (*Canis latrans*) (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005). Contudo estas seqüências fornecem matéria-prima para a identificação de marcadores para análises genéticas de em ampla escala da maioria das espécies canídeas.

A disciplina chamada de medicina da conservação estuda a inter-relação entre seres humanos, clima global, alteração do habitat e biodiversidade, incluindo populações silvestres, animais domésticos, patógenos, parasitos e poluentes (AGUIRRE, 2009). As alterações da volatilização atmosféricas e a deposição de poluentes juntamente com a inabilidade de adaptação de algumas espécies às relativamente rápidas alterações climáticas podem resultar em sua extinção em massa (THOMAS *et al.*, 2004). Algumas espécies podem ser utilizadas como sentinelas, servindo como indicadoras do seu ambiente e refletindo a qualidade da saúde do seu ecossistema. Os canídeos selvagens também podem ser bons sentinelas para doenças emergentes em cães provocadas através de vetores (TABOR & AGUIRRE, 2004).

O sistema citocromo P450 (P450s) é uma superfamília de hemoproteínas constituída de aproximadamente 500 membros distribuídos entre mais de 70 subfamílias encontradas em eucariotos e procariotos (NELSON *et al.*, 1996). Os múltiplos sistemas enzimáticos CYP apresentam um papel importante no metabolismo oxidativo de uma ampla variedade de componentes endógenos e exógenos, incluindo



esteróides, ácidos graxos, drogas e xenobióticos. A diferença nas características das isozimas CYP ou sua abundância relativa pode levar a alteração nos níveis de poluentes ambientais acumulados (HOSHI, 1998).

Estudos sugerem que as atividades enzimáticas das P450 e GST podem servir como biomarcadores para contaminação ambiental por hidrocarbonetos aromáticos como PAHs, PCDDs, PCDFs e PCBs (ISHIZUKA, 1998; HOSHI, 1998). O metabolismo da P450 pode levar também à ativação de procarcinógenos e à formação de metabolitos tóxicos (PARK *et al.*, 1995). Várias enzimas da família P450 humana mostraram apresentar expressão polimórfica, principalmente *CYP2D6* (MEYER *et al.*, 1986). A enzima codificada por ele é necessária ao metabolismo de mais de 25% das drogas comercialmente disponíveis e a uma proporção similar de agentes químicos ambientais (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 1999). Este polimorfismo é primariamente caracterizado por dois fenótipos: indivíduos com a atividade normal da *CYP2D6* (metabolizadores rápidos - EMs) e indivíduos com falta dessa atividade (metabolizadores lentos - PMs) (DAHL *et al.*, 1995; FROMM *et al.*, 1997; ROUSSEL *et al.*, 1998). Nos mamíferos, a maior parte dos xenobióticos é metabolizada por via hepática através das mono-oxigenases CYP (KOHLER *et al.*, 1997). O gene ortólogo em cães é chamado *cyp2d* ou *cyp2d15*. Apesar de que os membros da família do citocromo 450 possuem seqüências altamente conservadas entre as espécies, apresentando poucas diferenças na seqüência primária de aminoácidos, até mesmo essas pequenas diferenças podem dar origem a mudanças significativas na especificidade do substrato e na atividade catalítica destas enzimas.

Este estudo seqüenciou pela primeira vez cinco (5) exons do gene *cyp2d15* em quatro gêneros de canídeos Sul-Americanos: cachorro-do-mato, graxaim-do-campo, cachorro-vinagre e lobo-guará (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*). Foram identificadas diferenças importantes entre estes gêneros de canídeos e o cão doméstico: oito (8) SNPs em exons e dez (10) em introns distribuídos em quatro dos cinco exons estudados, assim como duas inserções em um dos introns analisados. O único snSNP foi identificado no exon 7 e resultou na substituição de uma valina por uma isoleucina em cachorro-do-mato, cachorro-vinagre e graxaim-do-campo. Quanto às duas inserções observadas, a primeira, ACTG, ocorreu

em cachorro-do-mato, cachorro-vinagre e graxaim-do-campo. Já a segunda, GACGA, apenas em lobo-guará. A obtenção de seqüências desse gene nesses animais poderá auxiliar, através de estudos funcionais, áreas como a medicina da conservação, farmacogenética, medicina veterinária e humana. Além disso, as atividades enzimáticas das enzimas P450 poderão ser úteis como biomarcadores para contaminação ambiental por hidrocarbonetos aromáticos como PAHs, PCDDs, PCDFs e PCBs. Esses polimorfismos contribuirão para a individualização de terapias medicamentosas, uma vez que aspectos toxicológicos de polimorfismos genéticos, toxicidade idiossincrática a drogas e agentes químicos já foram reportados (SATO, 2007). Esta pesquisa foi submetida à avaliação do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, obtendo as licenças necessárias para sua realização.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico de oito (8) canídeos de quatro gêneros diferentes, lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (TABELA 01), foi extraído a partir de amostras de sangue periférico através do método de “fenol clorofórmio” a fim de identificar possíveis variantes na seqüência do gene *cyp2d15*. Para isso foram testados vários pares de oligonucleotídeos iniciadores desenhados com o *software OligoAnalyzer 3*, com base no genoma canino disponível em bancos de dados públicos (NCBI, 2008). As melhores seqüências de oligonucleotídeos e temperaturas de hibridização foram definidas através de um gradiente de temperatura (TABELA 02) utilizando-se o termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*. Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com o corante fluorescente para ácidos nucleicos GelRed (Biotium) para visualização. Posteriormente os produtos da PCR foram quantificados pelo programa *TotalLab TL100*. As regiões codificantes e flanqueadoras dos exons 1, 6, 7, 8 e 9 do gene *cyp2d15*, foram seqüenciadas em ambas as direções no seqüenciador automático ABI Prism 3130 Avant *Automatic Sequencer* utilizando o *kit ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing* e posteriormente foram analisadas com o *software SeqScape v2.5* da *Applied Biosystems*.

TABELA 01 - ESPÉCIE, EXONS DO GENE *cyp2d15* SEQÜENCIADOS E NÚMERO DE ANIMAIS.

Espécie	Nome científico (gênero e espécie)	Exon	Nº de animais
Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	1,6,7,8,9	3
Cachorro-vinagre	<i>Speothos venaticus</i>	1,6,7,8	1
Graxaim-do-campo	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1,6,7,8	1
Lobo-guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	1,6,7,8,9	3
Total	4 gêneros		8

TABELA 02 - SEQÜÊNCIAS DE BASES DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, RESPECTIVOS EXONS, TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO E TAMANHO DO FRAGMENTO.

Oligonucleotídeos iniciadores	Exon	Temperatura de hibridização, (TA).	Tamanho do Fragmento
F 5'CTCCCTTTAGAAAGTGAGGC3'	1	58°C	638pb
R 5'CGGTTTCCTGACTGAGATG3'	1	58°C	
F 5'CAGGAAAGAGGATCGAGGCG3'	6	60°C	333pb
R 5'ATTGTCCCGGACTCCTCACT3'	6	60°C	
F 5'TCTCTCCCTCTGCCCCAGAG3'	7	60°C	241pb
R 5'CCCAGGCTGTCCATCCTCTC3'	7	60°C	
F 5'TCAGACGTCGGAGTCCAGAC3'	8	58°C	293pb
R 5'CAGCATCAGGCTGTGACCAC3'	8	58°C	
F 5'CGCTGGGGAAGACAGGCTGA3'	9	60°C	136pb
R 5'AAGCTCCTGGGCACCCTCTC3'	9	60°C	

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. EXONS

Comparando as seqüências obtidas com a do cão doméstico, foram observados polimorfismos de base única (SNP) nos exons: 1, 6, 7 e 8, TABELA 03. Foram identificados dois SNPs sinônimos não descritos na literatura no exon 1 (Ile58>Ile; Cys59>Cys) no lobo-guará. O exon 6 apresentou dois SNPs sinônimos (Ala246>Ala; Asp276>Asp) nos cachorro-vinagre, lobo-guará e graxaim-do-campo. O exon 7 apresentou um SNP sinônimo (Leu298>Leu) e um SNP não sinônimo (Val307>Ile), em cachorro-do-mato, cachorro-vinagre e graxaim-do-campo. A distância físico-química entre os aminoácidos valina e leucina é 29 (GRANTHAN, 1974) e há apenas um aminoácido entre eles no modelo do anel obtido pelo método de Argyle, que ocorre em uma proporção de 60-90% das substituições de aminoácidos observadas (PIEBER & TOHA, 1983). O exon 8 apresentou dois SNPs sinônimos (Leu375>Leu; Thr381>Thr). A seqüência do exon 9 disponível no NCBI (número do acesso [NC\\_006592](#)) não corresponde as seqüências de aminoácidos reportadas comparando-as nas três matrizes de leitura possíveis (FIGURA 1) por SAKAMOTO *et al.* (1995 número de acesso BAA04220), pode ser um indicativo de que a sequência do exon 9 reportada seria na verdade um intron. Foram encontradas duas alterações nessa região.

TABELA 03 - EXONS, NÚMERO DE BASES SEQUENCIADAS SOBRE O NÚMERO TOTAL DE BASES DE CADA EXON, SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS (SN) SEGUIDAS DA ALTERAÇÃO NO AMINOÁCIDO E NÃO-SINÔNIMAS (NS) E ESPÉCIES QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.

Exon	N° Bases	snSNP	nsSNP	a.a.	SNP/pbs	Espécie (s)
1	189/189	Het 753C-T <sup>1</sup> Het 756C-T <sup>2</sup>	0	Ile58> Ile Cys59 >Cys	1/94,5	Lobo-guará <sup>1,2</sup>
6	177/177	2832G-A <sup>3</sup> 2922C-T <sup>4</sup>	0	Ala246>Ala Asp276>Asp	1/88,5	Graxaim-do-campo <sup>3,4</sup> , cachorro-vinagre <sup>4</sup> e lobo- guará <sup>4</sup>
7	141/141	3138C-T <sup>5</sup>	3165G-A <sup>6</sup>	Leu298>Leu Val307 >Ile	1/70,5	Cachorro-do-mato <sup>5,6</sup> , Graxaim-do-campo <sup>6</sup> , cachorro-vinagre.
8	186/186	3571 C-G <sup>7</sup> 3589 G-A <sup>8</sup>	0	Leu375>Leu Thr381>Thr	1/93	Cachorro-do-mato <sup>7</sup> , graxaim-do-campo <sup>7</sup> , cachorro-vinagre <sup>7,8</sup> e lobo- guará <sup>7</sup>

Legenda: Números sobrescritos representam as mutações presentes na raça.

Números que antecedem as bases representam a localização em relação à sequência de referência no NCBI, número do acesso [NC\\_006592](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O número onde o exon inicia e termina são respectivamente: exon 1: 580 e 760, exon 2: 1407 e 1578, exon 6: 2770 e 2938, exon 7: 3099 e 3232, exon 8: 3441 e 3621, exon 9: 3811 e 3889.

[illegible]

FIGURA 01 – MATRIZES DE LEITURA POSSÍVEIS PARA A SEQUENCIA DO EXON 9 .

Legenda: As bases representadas na cor preta indicam o intron e as vermelhas os exons, indicados na sequência referência NCBI número do acesso [NC 006592](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).. Os exons estão separados por códons com as letras abaixo deles indicando os aminoácidos.

### 3.2. INTRONS

As três regiões flangeadoras estudadas apresentaram um total de 10 SNPs e duas inserções (TABELA 04). Um total de 107 pares de bases do intron 1 foram seqüenciadas e os SNPs 480 G-A e 511 A-G foram identificados nas espécies lobo-guará e graxaim-do-campo respectivamente. Um total de 639 pares de bases do intron 2 foram seqüenciadas e apresentaram o SNP 828 C-G em lobo-guará e o SNP 875 A-G em graxaim-do-campo, cachorro-vinagre, lobo-guará e cachorro-do-mato, previamente reportado em cães das raças Poodle e Rottweiler. Nas 136 bases analisadas do intron três, as seguintes alterações foram observadas: 2687 G-A em lobo-guará, 2690 C-G em graxaim-do-campo, lobo-guará e cachorro-do-mato previamente reportada em Daschund, 2693 C-G e uma inserção ACTG na posição 2712 em cachorro-do-mato e graxaim-do-campo, os SNPs 2739 G-A e 2740 C-A em cachorro-vinagre e 2761 A-G nas quatro espécies de canídeos. Uma inserção GACGA na posição 2693 (intron 3) foi observada nos espécimes de lobo-guará.

TABELA 04 - INTRONS, NÚMERO DE BASES SEQÜENCIADAS DE CADA INTRON, E ESPÉCIES QUE SOFRERAM A MUTAÇÃO.

Região	pbs	SNP	InDel	SNPs/pbs	Espécie (s)
1	107	480 G-A <sup>1</sup> 511 A-G <sup>2</sup>	0	1/53,5	Lobo-guará <sup>1,2</sup> e graxaim-do-campo <sup>2</sup>
2	639	828 C-G <sup>3</sup> 875 A- G <sup>4</sup>	0	1/213	Graxaim-do-campo <sup>4</sup> , cachorro-vinagre <sup>4</sup> , lobo-guará <sup>3,4</sup> e cachorro-do-mato <sup>4</sup>
3	136	2687 G-A <sup>5</sup> 2690 C-G <sup>6</sup> 2693 C-G <sup>7</sup> 2739 G-A <sup>8</sup> 2740 C-A <sup>9</sup> 2761 A-G <sup>10</sup>	inACTG 2712 <sup>11</sup> inGACGA 2693 <sup>12</sup>	1/22,5	Cachorro-do-mato <sup>6,7,10,11</sup> Graxaim-do-campo <sup>6,7,10,11</sup> , cachorro-vinagre <sup>8,9,10,11</sup> e lobo-guará <sup>5,6,10,12</sup>
4	81/81	3814 G-A <sup>11</sup> 3828 G-A <sup>12</sup>		1/40,5	Cachorro-do-mato <sup>11, 12</sup>

Legenda: Números sobrescritos representam as mutações presentes na raça.

Números que antecedem as bases representam a localização em relação à seqüência de referência no NCBI número do acesso [NC\\_006592](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As regiões estão representadas da seguinte forma: região 1 = 107pb *upstream* exon 1, Região 2 = 639pb intron 1 completo, Região 3 = 136pb *upstream* exon 6 e a Região 4 = 183 intron 8 completo.

### 3.3. ALINHAMENTO

O exon 1 apresentou 100% de similaridade em um dos lobos-guará e 94,7% no outro. As outras três espécies de canídeos apresentaram 100% de similaridade com a sequência do cão doméstico (NCBI, 2010) quando alinhadas através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (FIGURA 02).

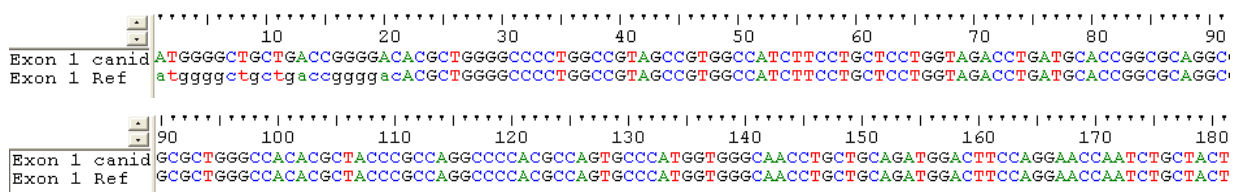


FIGURA 02 - ALINHAMENTO DO EXON 1 DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE CACHORRO-DO-MATO.

Sequências obtidas pelo programa *BioEdi Sequence Alignment Editor*: bases iguais apresentam a mesma cor, posição 1 representa a primeira base do exon e posição 180 a última base do exon. Primeira linha representada por Exon 1 canid é de um lobo-guará e a segunda a sequência referência do cão doméstico (NCBI).

O exon 6 apresentou 99,43% de similaridade entre o lobo-guará e a sequência referência o cão doméstico (NCBI, 2010) quando alinhadas através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (FIGURA 03).

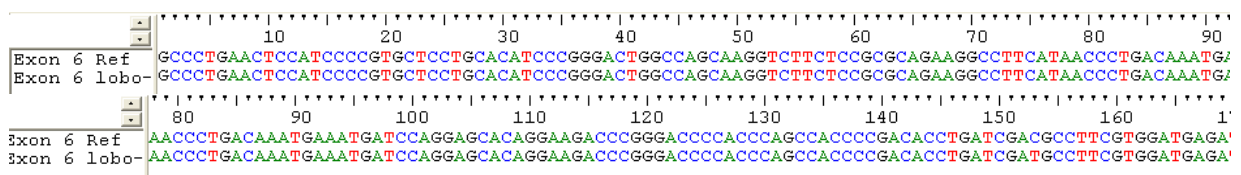


FIGURA 03 - ALINHAMENTO DO EXON 6 DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE LOBO-GUARÁ.

Sequências obtidas pelo programa *BioEdi Sequence Alignment Editor*: bases iguais apresentam a mesma cor, posição 1 representa a primeira base do exon e posição 169 a última base do exon. Primeira linha representada por Exon 6 Ref é a sequência referência do cão doméstico NCBI e a segunda representada por Exon 6 Lobo de um lobo-guará.

O exon 7 apresentou 99,29% de similaridade entre o graxaim-do-campo e a sequência referência o cão doméstico (NCBI, 2010) quando alinhadas através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (FIGURA 04).



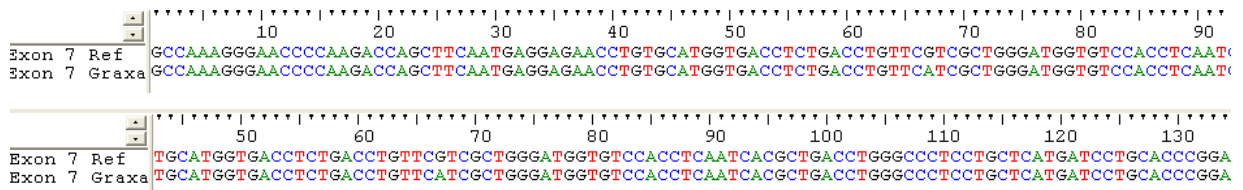


FIGURA 04 - ALINHAMENTO DO EXON 7 DA SEQÜÊNCIA REFERÊNCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE GRAXAIM-DO-CAMPO.

Sequências obtidas pelo programa *BioEdi Sequence Alignment Editor*: bases iguais apresentam a mesma cor, posição 1 representa a primeira base do exon e posição 134 a última base do exon. Primeira linha representada por Exon 7 Ref é a sequência referência do cão doméstico NCBI e a segunda representada por Exon 7 graxa de um graxaim-do-campo.

O exon 8 apresentou 99,46% de similaridade entre o cachorro-do-mato e a sequência referência o cão doméstico (NCBI, 2010) quando alinhadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (FIGURA 05).

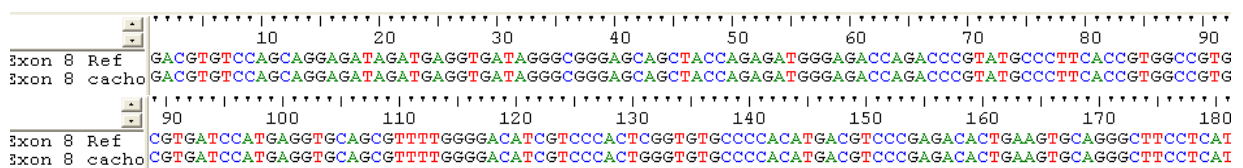


FIGURA 05 - ALINHAMENTO DO EXON 8 DA SEQÜÊNCIA REFERÊNCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE CACHORRO-DO-MATO.

Sequências obtidas pelo programa *BioEdi Sequence Alignment Editor*: bases iguais apresentam a mesma cor, posição 1 representa a primeira base do exon e posição 180 a última base do exon. Primeira linha representada por Exon 8 Ref é a sequência referência do cão doméstico NCBI e a segunda representada por Exon 8 cacho de um cachorro-do-mato.

O exon 9 apresentou 97,5% de similaridade entre o lobo-guará e a sequência referência o cão doméstico (NCBI, 2010) quando alinhadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (FIGURA 06).

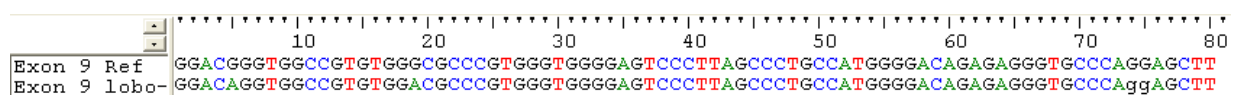


FIGURA 06 - ALINHAMENTO DO EXON 9 DA SEQÜÊNCIA REFERÊNCIA DO CÃO DOMÉSTICO COM UM ESPÉCIME DE LOBO-GUARÁ.

Sequências obtidas pelo programa *BioEdi Sequence Alignment Editor*: bases iguais apresentam a mesma cor, posição 1 representa a primeira base do exon e posição 80 a última base do exon. A primeira linha representada por Exon 9 Ref é a sequência referência do cão doméstico NCBI e a segunda representada por Exon 9 lobo de um lobo-guará.

### 3.4. REGIÕES FLANQUEADORAS

Todos os sítios de *splicing* identificados formam iguais entre as espécies de canídeos e do cão doméstico demonstrando alta conservação (TABELA 05). Os exons 6, 7 e 8 apresentaram sítios de *splicing* canônicos (AG/GT). O exon 1 inicia com GT como sítio de *splicing* doador e o exon 2 apresenta os sítios (AG/GC) não canônicos. No exon 9 (AG/GG) os sítios são não canônico.

TABELA 05 - ESTRUTURA GENÔMICA DO *cyp2d15* MOSTRANDO AS JUNÇÕES INTRON/EXON E OS TAMANHOS DOS INTRONS E EXONS.

Número do exon	Tam do exon (pb)	Sítio acceptor de <i>splicing</i>	Sítio doador de <i>splicing</i>	Tam do intron (pb)
5'UTR / Ex1	189		<u>tcagccag</u> GTaaggaagg	638
6	177	caccccg <b>cAG</b> gccctgaa	<u>tagaaaaa</u> GTgaggagtc	152
7	142	catggcct <b>AG</b> gccaaagg	<u>cgtgcagc</u> GTgagcccag	200
8	188	gtgtgtct <b>AG</b> gacgtgtc	<u>tccccaag</u> GTaggtctgc	181
9	83	ctgtgcac <b>AG</b> ggacgggt	<u>agcttctg</u> GGgnnnnnnn	282

#### 4. CONCLUSÕES

Através do seqüenciamento de DNA, o alinhamento com as seqüências depositadas no *GenBank* revelou similaridades que variaram de 97 e 100% na comparação entre as quatro espécies de canídeos e o cão doméstico nos 5 exons do gene *cyp2d15* analisados. Os quatro gêneros de canídeos Sul-Americanos, cachorro-do-mato, cachorro-vinagre, lobo-guará e graxaim-do-campo (*Cerdocyon thous*, *Speothos venaticus*, *Chrysocyon brachyurus* e *Lycalopex gymnocercus*) apresentaram grande similaridade entre as seqüências dos exons do gene *cyp2d15* analisados tanto entre si, quanto em comparação ao cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), o que corrobora com os trabalhos que encontraram uma origem evolutiva recente para essas espécies. A espécie *Canis familiaris* demonstrou ser útil para a confecção dos iniciadores para o gene *cyp2d15* de *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Chrysocyon brachyurus* e *Speothos venaticus*. Estudos funcionais necessitam ser realizados para avaliar o impacto das alterações encontradas neste trabalho a nível enzimático.

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasites & Vectors**, 2(Suppl 1):S7, 2009.

DAHL, M. L.; YUE, Q. Y.; ROH, H. K.; JOHANSON, I.; SAWE, J.; SJOQVIST, F.; BERTILSSON, L. Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. **Pharmacogenetics**, 5:159–164, 1995.

FROMM, M. F.; KROEMER, H. K.; EICHELBAUM, M. Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. **Drug Delivery Review**, 27: 171–199, 1997.

GRANTHAN, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. **Science**, 185: 862-864, 1974.

HOSHI, H. Drug metabolism and disposition. **Chemosphere**, 23:1301-1303, 1998.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, 20:342–349, 1999.

ISHIZUKA, M. Xenobiotic metabolizing enzymes as biomarkers for levels of environmental pollution. **Japanese Journal of Veterinary Research**, 46(2-3): 123-124, 1998.

KIRKNESS, E.F. *et al.* The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, 301(5641):1898-1903, 2003.

KOHLER D, HARTTER S, FUCHS K, SIEGHART W, HIEMKE C. *CYP2D6* genotype and phenotyping by determination of dextromethorphan and metabolites in serum of healthy controls and of patients under psychotropic medication. **Pharmacogenetics**, 7:453-61, 1997.

LINDBLAD, K.; WADE, M. C.; MIKKELSEN, S. T.; KARLSSON, K. E.; JAFFE, B. D. KAMAL, M. CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULBOKAS, E. J.; ZODY, M. C.; MAUCELI E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A.; PONTING, C. P.; GALIBERT, F.; SMITH, D. R.; DEJONG, P. J.; KIRKNESS, E. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, 438: 803-819, 2005.

MEYER, U. A.; GUT, J.; KRONBACH, T.; SKODA, C.; MEIER, U. T., CATIN, T. The molecular mechanisms of two common polymorphisms of drug oxidation--evidence for functional changes in cytochrome p450 isozymes catalysing bufuralol and mephenytoin oxidation. **Xenobiotica**, 16:449-464, 1986.

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information*. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em 18 de março de 2008 .

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information*. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em 10 de janeiro de 2010 .

NELSON, D. R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J. J., FEYEREISEN, R., *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, 6(1):1-42, 1996.

PARK, B. K.; PIRMOHAMED, M.; KITTERINGHAM, N. R. The role of P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. **Pharmacological and Therapeutics**, 68: 385-424, 1995.

PIEBER, M.; TOHA, J. Code dependent conservation of the physico-chemical properties in amino acid substitutions, **Original Life**, 13:139-146, 1983.

ROUSSEL, F.; DUIGNAN, D. B.; LAWTON, M. P.; OBACH, R.; STRICK, C. A.; TWEEDIE, D. J. Expression and characterization of canine cytochrome p450 2D15\*1. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 357(1):27-36, 1998.

SATOH; T. **Genetic polymorphism in drug metabolism and toxicity: Linking animal research and risk assessment in man** AATEX 14, Special Issue, 443-445 Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences Tokyo, Japan 21-25, 2007.

TABOR, G.M.; AGUIRRE, A.A: Ecosystem health and sentinel species: adding an ecological element to the proverbial “canary in the mineshaft”. **EcoHealth**, 1:226-228, 2004.

THOMAS, C. D.; CAMERON, A.; HANNAH, L.; *et al.*: Extinction risk from climate change. **Nature**, 427:145-148, 2004.

WOZENCRAFT, W. C. Order carnivora In: Mammal species of the world, London Press, 1100p., 2005.

## DISCUSSÃO GERAL

O gene *cyp2d15* foi estudado em cães da raça Beagle com finalidades farmacológicas ao final do século vinte (SAKAMOTO *et al.*, 1995; ROUSSEL *et al.*, 1998; PAULSON *et al.*, 1999). Algumas variantes alélicas foram identificadas por Roussel (1998), Paulson (1999) e seus respectivos colaboradores ao comparar suas sequências com as de mRNA publicadas por Sakamoto *et al.* (1995, número de acesso D17397.1). O projeto genoma canino só teve início anos mais tarde, foram dois projetos um privado, desempenhado pelo Instituto para Pesquisa Genômica (TIGR- *The Institute for Genomic Research*) em conjunto com o Centro de Genômica Avançada (TCAG- *The Center for Genomic Research*) que seqüenciou um cão da raça Poodle e, mais tarde, o acadêmico liderado pelo Instituto de Pesquisa do genoma Humano dos EUA (NHGRI- *US National Human Genome Research Institute*) que utilizou a raça Boxer. Ambas sequências foram publicadas e disponibilizadas em bancos de dados públicos (KIRKNES *et al.*, 2003; LINDBLAD TOH *et al.*, 2005). Ao compararmos as sequências de DNA genômico depositadas nos bancos de dados públicos ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) com as sequências obtidas no presente trabalho, pudemos observar que há algumas diferenças de nucleotídeos entre algumas regiões do gene *cyp2d15*. Por exemplo, ao compararmos a sequência de aminoácidos disponibilizada por Sakamoto e colaboradores (1995, número de acesso BAAO4220) com a sequência de aminoácidos prevista através dos códons dos exons 9, 10 e 11 do banco de dados público ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), observamos falta de correspondência códon/aminoácido. Nosso grupo de pesquisa seqüenciou o exon 9 e o analisou nas três matrizes de leitura possíveis. Observamos falta de correspondência com a seqüência de aminoácidos e a geração de um códon de finalização de tradução em uma das possíveis matrizes de leitura obtida. Ao compararmos as nossas sequências à sequência referência dos bancos de dados ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) encontramos apenas 2 nucleotídeos distintos nessa região supostamente chamada de exon 9. Esta grande similaridade entre a sequência encontrada por nós e a pública, indica que o fragmento pode estar corretamente seqüenciado, contudo por não corresponder aos aminoácidos, pode se tratar, na verdade, de um intron.

Os exons 10 e 11 disponíveis no NCBI tampouco correspondem a sequência de aminoácidos do gene *cyp2d15* disponibilizada por Sakamoto e colaboradores (1995, número de acesso BAAO4220). Nossas sequências obtidas para os exons 10 e 11 diferem, respectivamente, em 17 e 24 nucleotídeos da referência ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Ao compararmos nossos códons à sequência de aminoácidos disponibilizada por Sakamoto e colaboradores (1995, número de acesso BAAO4220), encontramos 100% similaridade. Isto pode indicar que há realmente 17 e 24 nucleotídeos, nos exons 10 e 11 respectivamente, que não correspondem a sequência correta dessa região no banco de dados público ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Foram desenhados 14 pares de oligonucleotídeos iniciadores correspondentes às regiões a jusante e a montante dos onze exons do gene *cyp2d15*. No entanto, só conseguimos validar os oligonucleotídeos iniciadores para os exons 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, sendo que os outros desenhados para os exons 3, 4 e 5 não hibridizaram em nenhuma das temperaturas utilizadas nos gradientes:  $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$  e  $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ . A falta de concordância entre as bases disponibilizadas para o gene *cyp2d15* nos bancos de dados público e a presença de regiões não seqüenciadas, representadas pela letra “n” no banco de dados, pode haver contribuído para o não funcionamento dos oligonucleotídeos desenhados para as regiões 3, 4 e 5.

Em relação aos canídeos Sul-Americanos, a espécie *Canis familiaris* demonstrou ser útil para a confecção dos iniciadores para o gene *cyp2d15* de *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Chrysocyon brachyurus* e *Speothos venaticus*. O alinhamento das sequências de DNA com as seqüências depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.org](http://www.ncbi.nlm.nih.org)) revelou similaridades que variaram de 97 e 100% na comparação entre as quatro espécies de canídeos e o cão doméstico nos 5 exons do gene *cyp2d15* analisados. Os quatro gêneros de canídeos Sul-Americanos, cachorro-do-mato, cachorro-vinagre, lobo-guará e graxaim-do-campo (*Cerdocyon thous*, *Speothos venaticus*, *Chrysocyon brachyurus* e *Lycalopex gymnocercus*) apresentaram grande similaridade entre as seqüências dos exons do gene *cyp2d15* analisados tanto entre si, quanto em comparação ao cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), o que corrobora com os trabalhos que encontraram uma origem evolutiva recente para essas espécies.



Outras regiões do gene *cyp2d15* precisam ser estudadas e estudos funcionais necessitam ser realizados no gene *cyp2d15* para avaliar o impacto das alterações encontradas a nível enzimático nas espécies *Canis familiaris*, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Chrysocyon brachyurus* e *Speothos venaticus*.

## ANEXOS

1. LISE E HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	80
2. EXTRAÇÃO DO DNA.....	82
2.1 Extração de DNA pelo método do fenol clorofórmio.....	82
2.2 Extração de DNA pelo método de “ <i>Salting out</i> ”.....	82
3. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>cyp2d15</i> .....	84
4. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DO GENE <i>cyp2d15</i> AMPLIFICADO.....	85
5. SEQÜENCIAMENTO, PRECIPITAÇÃO E DESNATURAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXONS DO GENE <i>cyp2d15</i> AMPLIFICADOS	86

## 1. LISE E HOMOGENEIZAÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE:

- Completar a amostra de sangue até 14ml com tampão de lise (TE\*), homogeneizar com o auxílio de uma pipeta e centrifugar a 2.500 rpm por 12 minutos.
- Descartar o sobrenadante. No material precipitado, acrescentar 10 ml de tampão de lise (TE\*), homogeneizar com a pipeta e centrifugar a 2.500 rpm por 12 minutos.
- Descartar o sobrenadante. No material precipitado, acrescentar 10 ml de tampão de lise (TE\*), homogeneizar com a pipeta e centrifugar a 2.500 rpm por 12 minutos. Até a obtenção de um pellet de leucócitos limpo.
- Armazenar a -20°C até o momento da extração de DNA.

### **\*Tampão de lise – RCLB (*Red Cell Lysis Buffer*)**

#### **Composição**

- Tris-HCl 1M (pH 7,2)
- NaCl 5M
- MgCl<sub>2</sub> 1M

## **EXTRAÇÃO DO DNA**

### **1.1 Extração de DNA pelo método de fenol clorofórmio com modificações (BASHIRUDDIN *et al.*, 1999)**

- Adicionar clorofórmio V/V e homogeneizar em vortex.
- Acrescentar 250ul de solução de precipitação protéica, homogeneizar em vortex (metade do volume do clorofórmio).
- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
- Pipetar a fase aquosa para outro tubo de 2ml e acrescentar duas vezes o volume pipetado de etanol absoluto resfriado. Incubar por 10 minutos em gelo.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos. Aparecerá um pellet, descartar o sobrenadante.
- Lavar o sedimento com 300ul de etanol 70% resfriado.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem e centrifugação.
- Secar o pellet por 24 horas em temperatura ambiente.
- Ressuspender o pellet em 100 ul de água ultra pura. Incubar a 55°C por 20 minutos.
- Verificar a concentração do DNA e conservar a – 20°C.

### **1.1 Extração de DNA pelo método de “*salting out*” com modificações (BIGNON & FERNANDEZ-VIÑA, 1997)**

- Adicionar 100 ul de solução saturada de NaCl 6M e homogeneizar em vórtex.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.

- Pipetar o sobrenadante para outro tubo de 2ml e acrescentar 1.000 ul de etanol absoluto resfriado, inverter algumas vezes gentilmente com o tubo fechado.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos . Aparecerá um pellet, descartar o sobrenadante.
- Lavar o sedimento com 1.000 ul de etanol 70% resfriado.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem e centrifugação.
- Secar o pellet por 24 horas em temperatura ambiente.
- Ressuspender o pellet em 100 ul de água milliQ estéril. Incubar a 55°C por 20 minutos.
- Verificar a concentração do DNA e conservar a – 20°C.

### 3. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 1, 2, 6, 7, 8, 9 E 10 DO GENE *cyp2d15*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se os componentes citados na TABELA 1 em microtubos de 200µl.

TABELA 1 – REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde	60ng
Tampão Taq 10X	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,75µl
dATP (10mM)	0,5µl
dGTP (10mM)	0,5µl
dCTP (10mM)	0,5µl
dTTP (10mM)	0,5µl
Primer <i>OR_U</i> (10µM)	1,0µl
Primer <i>OR_U</i> (10µM)	1,0µl
Enzima <i>Taq polimerase</i>	0,25µl
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 25µl

Os microtubos preparados com os reagentes foram submetidos às condições apresentadas na TABELA 2 (no termociclador *Eppendorf MasterCycler Gradient*).

TABELA 2 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA PCR

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	1 minutos
	96°C	15 segundos
35 ciclos	58°C	15 segundos
	60°C	2 minutos
1 ciclo	4°C	∞

#### 4. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXONS DO GENE *cyp2d15* AMPLIFICADOS

Antes de prosseguir com a reação de seqüenciamento é necessário purificar os produtos de PCR, pois a presença de nucleotídeos livres e oligonucleotídeos iniciadores residuais comprometem a análise do seqüenciamento.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados através do método enzimático utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) da USB Corporation®. Esse método consiste na atividade nuclease da EXO I em degradar oligonucleotídeos fita simples (*primers*) e na atividade da SAP de desfosforilar nucleotídeos trifosfatos (dNTPs) não incorporados durante a reação de PCR. Essas enzimas têm atividade ótima na temperatura de 37°C e são desnaturadas a temperatura superior a 65°C por um tempo de 15 minutos.

Os reagentes foram utilizados nas concentrações presentes na TABELA 3 e submetidos às condições de ciclagem presentes na TABELA 4 no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*.

TABELA 3 - REAGENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

Reagentes	Volume/Quantidade
Produto de PCR	10µl
EXO I (10U/µl)	0,6,0µl
SAP (1U/µl)	2,0µl

TABELA 4 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	37°C	45 minutos
1 ciclo	80°C	15 minutos

## 5. SEQÜENCIAMENTO, PRECIPITAÇÃO E DESNATURAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXONS DO GENE *cyp2d15* AMPLIFICADOS

Após a purificação dos produtos de PCR, essas foram seqüenciadas com o “*kit BigDye 3.1 Terminator*” (Applied Biosystems), conforme o protocolo da TABELA 5.

TABELA 5 - REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Reagentes	Volume/Quantidade
Terminator Ready Mix	1µl
Produto de PCR purificado	4µl
Primers específico (U ou L)	1,6 pmol
Save Money	0,5 µl
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 10µl

Os microtubos preparados com os reagentes foram submetidos às condições de ciclagem descritas na TABELA 6 (no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*).

TABELA 6 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO DOS EXONS DO GENE *cyp2d15*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	1 minuto
	96°C	15 segundos
35 ciclos	58°C	15 segundos
	60°C	2 minutos
1 ciclo	4°C	∞

Posteriormente, as amostras foram precipitadas com acetato de amônia 7,5M e etanol 96% para obtenção dos diversos fragmentos amplificados e retirada dos iniciadores, terminadores fluorescentes e outras impurezas. O produto purificado foi ressuspensionado em 15µl de formamida e desnaturado a 96°C por 8 minutos no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*, seguido por choque térmico em freezer -80°C por 40 segundos. Por fim, os fragmentos foram analisados em seqüenciador automático ABI-3130 *Applied Biosystems*, polímero POP7 e capilar de 80cm. Os dados obtidos foram coletados pelo programa SeqScape (fornecido pela Applied Biosystems) para análise posterior.



